

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA CAROLINA VIEIRA DA ROCHA

UTILIZAÇÃO DE ENSAIOS DE EMBRIOGÊNESE E RT-qPCR PARA  
DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE OVOS DE *Ascaris suum* EM LODO DE  
ESGOTO DOMÉSTICO

CURITIBA

2015

MARIA CAROLINA VIEIRA DA ROCHA

UTILIZAÇÃO DE ENSAIOS DE EMBRIOGÊNESE E RT-qPCR PARA  
DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE OVOS DE *Ascaris suum* EM LODO DE  
ESGOTO DOMÉSTICO

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutor em Engenharia  
de Recursos Hídricos e Ambiental, do  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Recursos Hídricos e  
Ambiental - PPGERHA, da Universidade  
Federal do Paraná

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina Borba  
Braga, PhD

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Karin Braun Prado

CURITIBA

2015

---

R672u

Rocha, Maria Carolina Vieira da

Utilização de ensaios de embriogênese e RT-qPCR para determinação da viabilidade de ovos de *Ascaris suum* em lodo de esgoto doméstico/ Maria Carolina Vieira da Rocha. – Curitiba, 2015.

172 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental, 2015.

Orientadora: Maria Cristina Borba Braga – Co-orientadora: Karin Braun Prado.

Bibliografia: p. 149-166.

1. *Ascaris suum*. 2. Microorganismos patogênicos. 3. Lodo de esgoto. 4. Helmintos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Braga, Maria Cristina Borba. III. Prado, Karin Braun. IV. Título.

CDD: 363.728493

---



## TERMO DE APROVAÇÃO

### MARIA CAROLINA VIEIRA DA ROCHA

#### “Utilização de ensaios de embriogênese e RT-qPCR na determinação da viabilidade de ovos de *Ascaris suum* em lodo de esgoto doméstico”

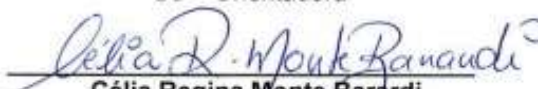
Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

PRESIDENTE:

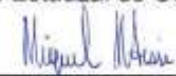
  
\_\_\_\_\_  
**Maria Cristina Borba Braga**  
Universidade Federal do Paraná  
Orientador

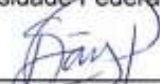
MEMBROS:

  
\_\_\_\_\_  
**Karin Braun Prado**  
Universidade Federal do Paraná  
Co – Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
**Célia Regina Monte Barardi**  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
\_\_\_\_\_  
**Ana Tereza Bittencourt Guimarães**  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

  
\_\_\_\_\_  
**Miguel Mansur Aisse**  
Universidade Federal do Paraná

  
\_\_\_\_\_  
**Juan Masías Sáñez Pacheco**  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 16 de março de 2015

**A quem me faz sorrir,**

**Malu menina.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, Sempre.

A minha linda família, Malu e Leo. Amo vocês, obrigada por existirem.

Aos meus pais, Graça e Jazonir, por tudo que sou hoje.

A minha orientadora e amiga Maria Cristina, por todos estes (muitos) anos de amizade e conquistas. E pelos outros que ainda virão.

A minha coorientadora Karin Braun, pela amizade e torcida, não importando o quanto o tempo passe.

À Denise Cabral e Iva Machado, a família que escolhi.

Aos melhores amigos do mundo Luciane Prado e Guilherme Polak. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Ou pelo menos não teria sido tão divertido.

À Thays Kurek Sehenem, pela amizade, torcida e por contar 2 milhões de ovos. Melhor IC do mundo.

Aos amigos queridos Jana Beraldi, Monica Eboly, Natália Dias, Patricia Arns, Raquel Pompeo, Gui Samways, Juan Sanes, Anderson Frigo, Sérgio Braga, Simone Bittencourt, Roseli Prado, Andressa Benetti, Carla Bem, Renata Correa, Heloise Knapik, Margret Engel, Cinthia Lima, Juliane Rizzi, Julio Werner, Cesar Destro, Adelino Maccarini, Daniel Detzel, Ana Paula Muhlenhoff.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica- CME da UFPR, e aos sempre amigos Vera Regina, Rosângela e Luiz.

À Companhia de Saneamento do Paraná - SANEPAR e aos gestores Anderson Ribaski e Angelica de Araujo, pela disponibilidade e auxílio no desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, e à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, pelo suporte financeiro.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental da Universidade Federal do Paraná, pelos recursos e instalações essenciais para a realização deste estudo.

***“Comece pelo que é correto, não pelo que é aceitável.”***

Franz Kafka (1883-1924)

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo a otimização de um método para a determinação de ovos viáveis de *Ascaris* em lodo de esgoto, utilizando-se técnicas de biologia molecular. Inicialmente, visando avaliar a qualidade do método convencional adotado pela resolução CONAMA N° 375/ 2006 (USEPA, 2003) para quantificação de ovos viáveis de *Ascaris* em amostras de lodo e compostos, foram realizados ensaios de recuperação. Assim, amostras de lodo centrifugado, anaeróbio e aeróbio, de estações de tratamento de esgoto da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil, foram coletadas em três períodos distintos. Os ensaios de recuperação consistiram na adição de quantidades conhecidas de ovos de *Ascaris suum* nas amostras de lodo que, a seguir, foram processadas de acordo com o protocolo estabelecido pela USEPA (2003). Os resultados produzidos indicam que a acurácia do método adotado pelo CONAMA, para ambos lodos aeróbios e anaeróbios, encontra-se abaixo do esperado. O valor máximo de recuperação dos ovos inoculados foi 59,8% para amostras de lodo anaeróbio, e 25% para amostras de lodo aeróbio. Vale ressaltar que, de acordo com o método especificado pela USEPA, a acurácia na recuperação de ovos de lodo anaeróbio deve ser 75%. Esta baixa recuperação parece estar relacionada a perdas durante o processamento das amostras, assim como às dificuldades inerentes à contagem dos ovos em microscopia óptica, técnica subjetiva e dependente da acuidade visual do analista. Dessa forma, visando sanar estas dificuldades, um método baseado na técnica da RT-qPCR foi otimizado, fundamentando-se na determinação de RNA mensageiro exclusivo da fase embrionária de *Ascaris*. Para o desenvolvimento do novo protocolo, estudos morfológicos, embriogênicos e moleculares foram levados a efeito, auxiliando na elaboração da estratégia mais adequada para a realização dos ensaios. Como resultado, foi possível identificar a presença de ovos viáveis de *A. suum* em todas as amostras de lodo inoculadas (N=33), com exceção de duas amostras de lodo aeróbio. Apesar de não ter sido possível realizar a quantificação dos ovos de *A. suum*, o método permitiu a identificação de ovos viáveis, mesmo em baixas concentrações, e após três dias de incubação. É importante salientar que, em um futuro próximo, este método poderá ser útil para o monitoramento de técnicas que visem à remoção total do parasita, em amostras de lodo de esgoto ou em outras amostras ambientais.

**Palavras-chave:** *Ascaris suum*, diagnóstico molecular de patógenos; lodo de esgoto sanitário; ovos viáveis de helmintos



## ABSTRACT

This study aimed at optimizing a method for the determination of viable *Ascaris* eggs in sewage sludge, using techniques of molecular biology. Initially, aiming to evaluate the quality of the method adopted by CONAMA No. 375/ 2006 (USEPA, 2003) for the quantification of viable *Ascaris* eggs from sludge samples and compounds, recovery assays were performed. Thus, anaerobic and aerobic sludge samples from sewage treatment plants in Curitiba, Paraná, Brazil were collected, at three different periods. Recovery assays were carried out by the addition of a known quantity of eggs of *Ascaris suum* to sludge samples, which were processed according to the protocol designed by the USEPA (2003). The results produced allow pointing out that the accuracy of this methodology, for both aerobic and anaerobic sludge, was below expectation. Regarding the results for the accuracy of recovery of eggs from aerobic sludge, the maximum value was 25%, whereas for anaerobic sludge the accuracy was to 59,8%. It is worth mentioning that according to the protocol specified by USEPA the accuracy for anaerobic sludge should be 75%. The low recovery appears to be associated with losses during the procedures of processing the samples, as well as inherent difficulties related to the quantification of the eggs using optical microscopy. This is due to the subjectivity of the technique that is dependent on the visual acuity of the analyst. Thus, to circumvent these difficulties, a biomolecular methodology based on RT-qPCR technique was optimizing. The principle of the method is based on the determination of exclusive messenger RNA of the embryogenesis of *Ascaris*. The development of the new protocol was based on morphological, embryogenic and molecular studies that were used to support the choice of the most appropriate strategy for the accomplishment of the assays. The results obtained made possible the identification of the presence of viable eggs of *A. suum* in all tested sludge samples (N = 33), exception made for two samples of aerobic sludge. In spite of had not been possible to quantify the *A. suum* eggs, the method enabled the identification of viable eggs, even at low concentrations, and after only three days of incubation. It can be stressed that in the near future, the approach adopted for the quantification of viable helminth eggs using molecular techniques can become an important tool for the monitoring of techniques aimed at the complete removal of the parasite in sludge or other environmental matrices.

**Key-words:** *Ascaris suum*, molecular diagnosis of pathogens; sewage sludge; helminth viable eggs

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1– FLUXOGRAMA TÍPICO DE UMA ETE COMPLETA.....	26
FIGURA 2.2 – FLUXOGRAMA DE UMA ETE COM TRATAMENTO SECUNDÁRIO POR LODOS ATIVADOS COM AERAÇÃO PROLONGADA.....	27
FIGURA 2.3 – FLUXOGRAMA DE UMA ETE COM TRATAMENTO SECUNDÁRIO POR REATOR UASB.....	27
FIGURA 2.4 – PÁTIO DE ESTOCAGEM DE LODO DE ESGOTO CALEADO - ETE BELÉM (SANEPAR), CURITIBA, BRASIL .....	29
FIGURA 2.5 – FATORES A SEREM CONSIDERADOS PARA A SELEÇÃO DA MELHOR ESTRATÉGIA DE GESTÃO DE LODOS DE ESGOTO .....	31
FIGURA 2.6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA GERAL DAS PRINCIPAIS ETAPAS PARA DETERMINAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE HELMINTOS EM AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO .....	43
FIGURA 2.7 – FOTOMICROGRAFIA DE OVOS DE <i>Ascaris</i> sp.....	48
FIGURA 2.8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA UTILIZANDO-SE SONDA TAQMAN®.....	55
FIGURA 2.9 - NÚMERO DE CICLOS VS FLUORESCÊNCIA ( $\Delta$ RT) OBTIDO EM ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL.....	56
FIGURA 2.10 – CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA EM ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL.....	57
FIGURA 2.11 – SEQUÊNCIA DO DNA COMPLEMENTAR DO mRNA DE <i>alep1</i> DE <i>Ascaris lumbricoides</i> .....	61
FIGURA 2.12 – ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO cDNA DE <i>alep1</i> DE <i>Ascaris lumbricoides</i> PELO ALGORITMO BLAST®.....	63
FIGURA 2.13 – ETAPAS NECESSÁRIAS AO PROCESSO DE VALIDAÇÃO DE NOVO ENSAIO BIOLÓGICO .....	69
FIGURA 3.1 – AMOSTRAGEM DE LODO: A) COLETA DE LODO CENTRIFUGADO-ETE BELÉM; B) SAÍDA DE LODO CENTRIFUGADO E CALEADO – ETE BELÉM; C) CENTRÍFUGA- ETE ATUBA SUL; D) SISTEMA PARA CALEAÇÃO DE LODO- ETE ATUBA SUL.....	74
FIGURA 3.2 – TIPOS DE LODOS AMOSTRADOS: A) LODO ANAERÓBIO APÓS CENTRIFUGAÇÃO E SEM CALEAÇÃO (AN); B) LODO ANAERÓBIO CENTRIFUGADO E CALEADO (AC); C) LODO AERÓBIO APÓS CENTRIFUGAÇÃO E SEM CALEAÇÃO	

(BN); D) LODO AERÓBIO CENTRIFUGADO E CALEADO (BC).....	74
FIGURA 3.3 - PRINCIPAIS ETAPAS DA METODOLOGIA USEPA (2003) PARA QUANTIFICAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE <i>Ascaris</i> EM LODO.....	77
FIGURA 3.4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DO ENSAIO CONVENCIONAL DE RECUPERAÇÃO DE OVOS DE <i>Ascaris suum</i> INOCULADOS EM AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO.....	80
FIGURA 3.5 – MICROPÉROLAS DE VIDRO PARA LISE MECÂNICA DE CÉLULAS DE <i>A. suum</i> .....	87
FIGURA 3.6 – DIAGRAMA DO ENSAIO BIOMOLECULAR PARA DETERMINAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE <i>Ascaris</i> .....	93
FIGURA 4.1 – OVOS DE <i>A. SUUM</i> EM SOLUÇÃO DE FORMALINA 0,5% A) OVO COM MEMBRANA MAMILONADA; B) OVO DECORTICADO.....	97
FIGURA 4.2 – OVOS DE <i>A. suum</i> APÓS INCUBAÇÃO A 28°C, POR 21 DIAS: A) OVO INVIÁVEL; B) OVO VIÁVEL (LARVADO).....	98
FIGURA 4.3 – RESULTADOS DO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS DE ANÁLISE DE DIFERENÇA ENTRE GRUPOS, APLICADO AOS DIFERENTES TIPOS DE LODO.....	103
FIGURA 4.4 – RESULTADOS DO TESTE U DE MANN-WHITNEY DE ANÁLISE DE DIFERENÇA ENTRE DUAS AMOSTRAS: A) LODOS ANAERÓBIOS AN E AC; B) LODOS AERÓBIOS BN E BC.....	104
FIGURA 4.5 – RESULTADOS DO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS DE ANÁLISE DE DIFERENÇA ENTRE GRUPOS, APLICADO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO : A) AN, B) AC, C) BN, D) BC.....	105
FIGURA 4.6 – PARTÍCULAS DE LODO (SETAS) NÃO REMOVIDAS NAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO: A) FLOTAÇÃO; B) PENEIRAMENTO (400 MESH).....	108
FIGURA 4.7 – OVO DE <i>Ascaris suum</i> (SETA) EM MEIO A PARTÍCULAS INTERFERENTES À VISUALIZAÇÃO EM MICROSCOPIA ÓPTICA.....	108
FIGURA 4.8 – ESTRUTURAS SIMILARES A GRÃOS DE PÓLEN, VISUALIZADAS DURANTE A ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS AMOSTRAS.....	109
FIGURA 4.9 – OVOS DE <i>Ascaris suum</i> (SETAS) AGRUPADOS EM AMOSTRA AN1, INOCULADA COM 10 OVOS/ G ST.....	109
FIGURA 4.10 – OVOS DE OUTROS HELMINTOS OBSERVADOS NAS AMOSTRAS DE LODO ANALISADAS: A) <i>Trichuris trichiura</i> ; B) <i>Taenia</i> sp.; C) <i>Hymenolepis diminuta</i> ; D) ANCILOSTOMÍDEO.....	110

FIGURA 4.11 – AMOSTRA BN1, APÓS LIQUIDIFICAÇÃO E SEDIMENTAÇÃO A 4 °C, POR 4 HORAS. ....	111
FIGURA 4.12 – SEDIMENTOS APÓS INCUBAÇÃO A 28 °C, POR 21 DIAS: A) AMOSTRA BN1; B) AMOSTRA AN1.....	112
FIGURA 4.13 – MICRORGANISMOS SIMILARES A <i>Nocardia</i> sp.....	112
FIGURA 4.14 – MORFOLOGIA DOS OVOS DE <i>A. suum</i> EM MEV: A) OVO COM MEMBRANA MAMILONADA; B) DETALHE DA JUNÇÃO ENTRE AS MEMBRANAS MAMILONADA E VITELÍNICA; C) OVO PARCIALMENTE DECORTICADO; D) OVO DECORTICADO .....	115
FIGURA 4.15 – ULTRAESTRUTURA DA CASCA DE OVO DE <i>A. suum</i> : M - MEMBRANA MAMILONADA; V - MEMBRANA VITELÍNICA; Q- MEMBRANA QUITINOSA; L - MEMBRANA LIPÍDICA.....	116
FIGURA 4.16 – ETAPAS DA EMBRIOGÊNESE DE <i>A. suum</i> : A) OVO COM UMA CÉLULA GERMINATIVA; B) DUAS CÉLULAS; C) QUATRO CÉLULAS; D) MÓRULA INICIAL; E) MÓRULA TARDIA; F) BLÁSTULA; G) GÁSTRULA; H) LARVA 1; I) LARVA 2 .....	118
FIGURA 4.17 – DESENVOLVIMENTO DE OVOS DE <i>Ascaris suum</i> (N=30), EM CONCENTRAÇÃO DE 1600 OVOS ML <sup>-1</sup> E DURANTE 21 DIAS DE INCUBAÇÃO .....	121
FIGURA 4.18 – DESENVOLVIMENTO DE OVOS DE <i>Ascaris suum</i> (N=30), EM CONCENTRAÇÃO DE 320 OVOS ML <sup>-1</sup> E DURANTE 21 DIAS DE INCUBAÇÃO .....	122
FIGURA 4.19 – INTERFACE ENTRE O PROGRAMA BIOESTAT 5.0 E A SAÍDA DOS RESULTADOS OBTIDOS PELO TESTE DE MANTEL: A) 1600 OVOS ML <sup>-1</sup> ; B) 320 OVOS ML <sup>-1</sup> .....	128
FIGURA 4.20 – OVOS DE <i>A. suum</i> VISUALIZADOS APÓS TRATAMENTO DE LISE ...	131
FIGURA 4.21 – AMPLIFICAÇÃO LINEAR DO cDNA DE <i>A. suum</i> OBTIDO A PARTIR DE SUSPENSÕES DE OVOS INCUBADOS POR TRÊS DIAS.....	136
FIGURA 4.22 – AMPLIFICAÇÃO LINEAR DO CDNA CONCENTRADO DE <i>A. suum</i> OBTIDO A PARTIR DE SUSPENSÕES DE OVOS INCUBADOS POR TRÊS DIAS .....	137
FIGURA 4.23 – AMPLIFICAÇÃO LINEAR DO cDNA DE <i>A. suum</i> OBTIDO A PARTIR DE SUSPENSÕES DE OVOS INCUBADOS POR SETE DIAS.....	139
FIGURA 4.24 – AMPLIFICAÇÃO LINEAR DO cDNA DE <i>A. suum</i> OBTIDO A PARTIR DE SUSPENSÕES DE OVOS INCUBADOS POR 21 DIAS .....	140
FIGURA 4.25 – AMPLIFICAÇÃO LINEAR DO CDNA DE <i>A. suum</i> OBTIDO A PARTIR DE AMOSTRAS DE LODO DA PRIMEIRA CAMPANHA DE COLETAS .....	143

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 2.1 – CONCENTRAÇÕES MÁXIMAS DE PATÓGENOS PARA LODOS DE ESGOTO CLASSES A E B.....	34
QUADRO 2.2 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS ESPÉCIES <i>ASCARIS SUUM</i> E <i>Ascaris lumbricoides</i> .....	38
QUADRO 3.1 – ORIGEM E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LODO ADOTADAS NESTE ESTUDO.....	73
QUADROS 3.2 – VARIÁVEIS UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DE TABELAS DE VIDA NA ECOLOGIA POPULACIONAL E SUA ADAPTAÇÃO PARA OS ENSAIOS DE EMBRIOGÊNESE DE <i>A. suum</i> .....	83
QUADRO 3.3 – SEQUÊNCIAS OLIGONUCLEOTÍDICAS DOS INICIADORES <i>FORWARD</i> E <i>REVERSE</i> E DA SONDA PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA DE <i>alep1</i> POR qPCR.....	90
QUADRO 3.4 – SEQUÊNCIAS OLIGONUCLEOTÍDICAS DOS INICIADORES <i>FORWARD</i> E <i>REVERSE</i> E DA SONDA PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA DE <i>ITS1</i> POR qPCR.....	92
QUADRO 4.1 – PRESENÇA DE SINAL DE AMPLIFICAÇÃO E VALOR DE CQ PARA AMOSTRAS DE LODO DA PRIMEIRA CAMPANHA E INOCULADAS COM OVOS DE <i>A. suum</i> .....	143

## LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – CARACTERÍSTICAS DE CINCO PRINCIPAIS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE OVOS DE HELMINTOS EM AMOSTRAS DE LODO .....	67
TABELA 4.1 – CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS (ST), FIXOS (SFT) E VOLÁTEIS (SVT) NAS AMOSTRAS DE LODO COLETADAS.....	96
TABELA 4.2 – NÚMERO DE OVOS TOTAIS, VIÁVEIS E INVIÁVEIS DE <i>A. SUUM</i> EM DIFERENTES DILUIÇÕES DA SUSPENSÃO PADRÃO .....	99
TABELA 4.3 – ACURÁCIA (% DE RECUPERAÇÃO) E VIABILIDADE (%) NA QUANTIFICAÇÃO DE OVOS DE <i>A. SUUM</i> PELA METODOLOGIA USEPA (2003) .....	102
TABELA 4.4 – QUANTIDADE DE OVOS DE <i>A. SUUM</i> (%) EM CADA ETAPA DA EMBRIOGÊNESE, POR DIA DE INCUBAÇÃO E EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ENSAIO .....	124
TABELA 4.5 – TABELA DE VIDA DE <i>ASCARIS SUUM</i> PARA AS CONCENTRAÇÕES 1600 OVOS ML <sup>-1</sup> E 320 OVOS ML <sup>-1</sup> .....	125
TABELA 4.6 – TRATAMENTOS DE LISE DE OVOS DE <i>A. SUMM</i> AVALIADOS DURANTE ESTE ESTUDO.....	130

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

alep1	<i>Ascaris lumbricoides eliminated protein</i> (gene)
ALEP1	<i>Ascaris lumbricoides eliminated protein</i> (proteína)
cDNA	DNA complementar
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cq	Ciclo de quantificação
Ct	<i>Threshold cycle</i> ou ciclo limite
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EAP	Estabilização alcalina prolongada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETE	Estação de tratamento de esgotos
FAM	6-carboxi-fluoresceína
g	Aceleração da gravidade
IPC	Controle interno positivo
ITS1	Espaçador transcrito interno 1
LOQ	Limite de quantificação do método
MDL	Limite de detecção do método
MEE	Modelagem por equações estruturais
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MGB	<i>Minor groove binder</i> - sonda
MRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
mt-cytB	Gene mitocondrial do citocromo b
NMP	Número mais provável
pb	Pares de base
PBS	Solução tampão de fosfato

PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>primer</i>	Oligonucleotídeo iniciador
PVP	Polivinilpirrolidona
qPCR	PCR em tempo real ou quantitativa
rpm	Rotação por minuto
Rn	Fluorescência normalizada
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
RT- qPCR	Transcriptase Reversa- PCR quantitativa
SDS	Sistema de Detecção de Sequências
SG	Gravidade específica
ST	Sólidos totais
TE	Tampão Tris-EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UASB	Reator anaeróbio de manta de lodo
UFP	Unidade Formadora de Placa
UFF	Unidade Formadora de Foco
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>HIPÓTESE.....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
OBJETIVO GERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
2.1 GERAÇÃO E GESTÃO DE LODO EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO .....	25
2.1.1 Tratamento e acondicionamento do lodo de esgoto.....	27
2.1.2 Definindo a estratégia adequada de gestão.....	30
2.2 SANIDADE DO LODO DE ESGOTO DOMÉSTICO.....	32
2.2.1 Ovos de helmintos em lodo de esgoto.....	35
2.3 <i>Ascaris</i> .....	36
2.3.1 <i>Ascaris lumbricoides</i> e <i>Ascaris suum</i> .....	37
2.3.2 Desenvolvimento Embrionário de <i>Ascaris</i> .....	38
2.4 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE HELMINTOS EM LODO DE ESGOTO.....	40
2.4.1 Amostragem.....	41
2.4.2 Separação e concentração dos ovos de <i>Ascaris</i> .....	42
2.4.2.1 Dessorção.....	43
2.4.2.2 Sedimentação e peneiramento.....	45
2.4.2.3 Flotação.....	45
2.4.2.4 Extração.....	46
2.4.3 Incubação.....	48
2.4.4 Determinação e quantificação de ovos viáveis.....	49
2.5 APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO DE PARASITAS	

EM LODO DE ESGOTO.....	50
2.5.1 Extração do material genético presente em amostras ambientais.....	50
2.5.2 PCR convencional.....	52
2.5.3 PCR em tempo real.....	54
2.5.4 RT-PCR.....	58
2.6 RT-PCR DE <i>Ascaris</i> EM FASE EMBRIOGÊNICA.....	59
2.7 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS: A BUSCA PELO 'GOLD STANDARD'.....	62
2.8 GARANTIA DE QUALIDADE-CONTROLE DE QUALIDADE (QA-QC).....	65
2.9 DESENVOLVENDO E VALIDANDO NOVOS ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	68
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>72</b>
3.1 AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA NA DETERMINAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE <i>ASCARIS</i> EM LODO DE ESGOTO PELA METODOLOGIA USEPA (2003).....	72
3.1.1 Amostragem de lodo de esgoto doméstico.....	72
3.1.2 Aquisição de ovos viáveis de <i>Ascaris suum</i> .....	75
3.1.2.1 Teste de viabilidade.....	76
3.1.3 Inoculação e recuperação de ovos viáveis de <i>A. suum</i> nas amostras de lodo: ensaios <i>split/ spike</i> .....	76
3.2 UTILIZAÇÃO DA RT-QPCR PARA A DETERMINAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE <i>A. SUUM</i> EM LODO DE ESGOTO.....	78
3.2.1 Análise morfológica e ultraestrutural dos ovos de <i>A. suum</i> .....	80
3.2.2 Acompanhamento da embriogênese de <i>A. suum</i> .....	82
3.2.2.1 Avaliação dos ensaios da embriogênese: tabelas de vida e teste de Mantel.....	82
3.2.3 Padronização do ensaio molecular para determinação de ovos viáveis de <i>Ascaris</i> em lodo de esgoto.....	84
3.2.3.1 Indução do desenvolvimento larval em ovos de <i>Ascaris suum</i> .....	84
3.2.3. Lise celular dos ovos de <i>Ascaris suum</i> .....	84
3.2.3.2.1 <i>Via Química</i> .....	85

3.2.3.2.2 Via Enzimática.....	85
3.2.3.2.3 Via Mecânica.....	86
3.2.3.3 Extração e purificação de RNA dos ovos de <i>A. suum</i> .....	87
3.2.3.4 Síntese do cDNA de <i>A. suum</i> .....	89
3.2.3.5 Amplificação de cDNA de <i>A. suum</i> .....	89
3.2.3.5.1 PCR convencional.....	89
3.2.3.5.2 Amplificação em tempo real (qPCR).....	90
3.2.4 Determinação de ovos viáveis de <i>Ascaris suum</i> em amostras de lodo de esgoto por ensaio molecular.....	92
3.3 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS REALIZADOS.....	93
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>95</b>
4.1 AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DA METODOLOGIA USEPA (2003) PARA DETERMINAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE <i>Ascaris</i> EM LODO DE ESGOTO.....	95
4.1.1 Concentração de sólidos nas amostras de lodo.....	95
4.1.2 Avaliação da viabilidade dos ovos de <i>Ascaris suum</i> .....	97
4.1.3 Avaliação da metodologia USEPA (2003) na recuperação de ovos viáveis de <i>Ascaris</i> em lodo de esgoto.....	99
4.1.3.1 Avaliação das perdas durante processamento das amostras e quantificação de ovos viáveis de <i>A. suum</i> pela metodologia USEPA (2003) .....	106
4.2 OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO BIOLÓGICO PARA DETERMINAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE <i>Ascaris</i> POR RT-qPCR.....	113
4.2.1 Morfologia e ultraestrutura dos ovos de <i>Ascaris suum</i> : avaliação em microscopia eletrônica.....	113
4.2.2 Desenvolvimento embrionário de <i>Ascaris suum</i> .....	116
4.2.2.1 Influência da concentração de ovos de <i>Ascaris</i> no desenvolvimento embrionário do parasita.....	119
4.2.2.2 Tabela de vida e análise do grau de correlação entre o tempo de incubação e desenvolvimento embrionário de <i>A. suum</i> .....	125
4.2.3 Análises moleculares.....	129

4.2.3.1 Lise dos ovos de <i>Ascaris suum</i> .....	129
4.2.3.2 Extração do RNA e síntese do cDNA de <i>Ascaris suum</i> .....	132
4.2.3.3 PCR convencional.....	134
4.2.3.4 Amplificação em tempo real (qPCR) do cDNA de <i>A. suum</i> .....	134
4.2.4 Determinação de ovos de <i>Ascaris</i> nas amostras de lodo de esgoto por método biomolecular.....	141
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>145</b>
<b>RESPOSTA À HIPÓTESE.....</b>	<b>146</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DA PESQUISA .....</b>	<b>147</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>148</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>166</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O lodo de esgoto é o principal subproduto sólido gerado durante o tratamento de esgotos domésticos. Apesar de sua geração ser diretamente proporcional à população atendida, o adequado gerenciamento do lodo é, muitas vezes, negligenciado no Brasil. Desta forma, não é raro observar este gerenciamento sendo realizado de forma emergencial pelos próprios operadores das estações de tratamento, ocasionando custos elevados, dificuldades operacionais e impactos ambientais. Entre as principais dificuldades no processo de gestão do lodo encontra-se a escolha da destinação final mais adequada para este subproduto, considerando-se aspectos técnicos, legais, econômicos e ambientais.

Desde a década de 1970, o uso do lodo de esgoto como fertilizante em cultivos e pastagens tem sido proposto como uma alternativa econômica à incineração e à disposição em aterros sanitários. Entretanto, para a utilização do lodo de esgoto na agricultura é necessário que este composto apresente elevados níveis de estabilização da matéria orgânica, além de sanidade adequada. Este lodo, cujas características químicas e biológicas são compatíveis com uma utilização produtiva, denomina-se bioestabilizado. No Brasil, a Resolução CONAMA nº 375, de 29 de agosto de 2006, especifica limites de patógenos para lodos de esgoto com potencial uso agrícola. O principal objetivo das normas reguladoras é fornecer diretrizes para a proteção da saúde pública e ambiental, considerando-se os benefícios e potenciais riscos do uso dos bioestabilizados.

Para que o lodo de esgoto atinja as condições sanitárias ideais, técnicas de higienização devem garantir a redução de patógenos até os limites aceitáveis especificados pela Resolução. Entretanto, para avaliar a eficiência da remoção destes organismos são necessários procedimentos adequados para a detecção e quantificação dos patógenos, antes e após o tratamento de higienização realizado.

Entre os organismos patogênicos que podem estar presentes no lodo de esgoto, os ovos de helmintos destacam-se devido à elevada resistência a condições adversas do meio e a sua baixa dose infectante. Entre estes parasitas, os pertencentes ao gênero *Ascaris* são normalmente utilizados como indicadores, pois além de serem encontrados em grande número em amostras de origem fecal, são bastante resistentes aos tratamentos de higienização do lodo. Assim, estes

organismos têm sido utilizados como controle na avaliação de técnicas para remoção de patógenos em amostras sanitárias. A metodologia adotada para o diagnóstico destes parasitas, portanto, deve apresentar alta sensibilidade e rapidez, aliadas à reprodutibilidade do método. Entretanto, o método adotado pela Resolução CONAMA nº 375/06 baseia-se em contagem visual por microscopia óptica, técnica laboriosa, que demanda tempo de laboratório e depende do treinamento e acuidade visual do analista.

A avaliação do protocolo da Agência Ambiental Americana (EPA 815-R-06-002), adotado pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente para a elaboração da Resolução nº 375/06, que define critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário, permitiu estabelecer a intenção principal desta tese. O fator preponderante foi instigar um debate sobre a qualidade dos resultados obtidos para a quantificação de ovos viáveis de helmintos pelo método de contagem convencional. Além disso, a pesquisa foi baseada na necessidade de estabelecer um novo protocolo para a determinação de ovos viáveis de *Ascaris* com elevada acurácia, que não dependa da subjetividade do método, nem da acuidade visual para a leitura em microscópio ótico.

Estudos em biologia molecular proporcionaram a aplicação de técnicas moleculares ao saneamento ambiental, e têm contribuído para um maior entendimento da composição, filogenia e fisiologia dos organismos presentes em lodos de esgoto e em águas residuárias domésticas. Entretanto, a principal dificuldade referente à determinação de ovos viáveis de *Ascaris* em amostras ambientais utilizando-se técnicas biomoleculares é a presença de material genético na forma de DNA, que pode encontrar-se livre no meio, ou ainda, no interior de células ou organismos inviáveis. O DNA é bastante estável e mantém-se íntegro por longos períodos, mesmo após a morte do organismo. Assim, quando utilizadas técnicas moleculares baseadas na detecção de DNA, a presença desta molécula no interior de ovos inviáveis de *Ascaris* pode gerar resultados falso-positivos, podendo ocasionar superestimação da real quantidade de ovos viáveis destes parasitas.

Diferentemente do DNA, as técnicas moleculares que utilizam o RNA como alvo possibilitam a detecção do material genético somente de organismos vivos, pois o material genético na forma de RNA é pouco estável e não se mantém íntegro fora de células funcionais.

Dessa forma, visando aumentar a rapidez dos procedimentos experimentais, e a confiabilidade dos resultados da identificação e determinação da viabilidade dos ovos de *Ascaris* em lodo de esgoto, a proposta desta tese foi otimizar um método, baseado em técnicas biomoleculares, para a detecção deste parasita. Para isso foi adotada a técnica da transcriptase reversa precedida à reação da polimerase em tempo real (RT-qPCR), utilizando como alvo o RNA mensageiro do gene *alep1* presente apenas nas fases iniciais de desenvolvimento embrionário de *Ascaris*.

## **HIPÓTESE**

A determinação de ovos viáveis de *Ascaris* em lodo de esgoto doméstico pode ser realizada por RT-qPCR utilizando o gene alvo *alep1* presente nas células embrionárias do parasita.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Utilizar ensaios de RT-qPCR do gene *alep1* para a determinação de ovos viáveis de *Ascaris suum* em lodo de esgoto doméstico.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a acurácia do método especificado pela Resolução CONAMA nº 375/06 para a determinação e quantificação de ovos viáveis de *Ascaris* em lodos de esgoto;
- Otimizar um método que faça uso da técnica da RT-qPCR para a determinação de ovos viáveis de *Ascaris* em lodo, baseado no material genético de *Ascaris suum*;
- Avaliar os resultados obtidos na determinação de ovos viáveis de *Ascaris* pelos métodos especificados pela Resolução CONAMA nº 375/ 2006, e baseado na técnica da RT-qPCR.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

A geração de lodo em estações de tratamento de esgoto (ETEs) é uma característica intrínseca dos processos de tratamento e tende a um aumento, no mínimo, proporcional ao crescimento da população humana (CONAMA, 2006). Sua gestão adequada deve envolver aspectos econômicos e ambientais, considerando-se a presença de alguns compostos tóxicos e perigosos em sua composição, como metais pesados e organismos patogênicos (JIMENEZ *et al.*, 2007; ARTHURSON, 2008). É fundamental, portanto, que formas adequadas e seguras de controle e disposição final deste subproduto sejam especificadas, minimizando os riscos à saúde pública e ambiental.

#### 2.1 GERAÇÃO E GESTÃO DE LODO EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO

O termo lodo refere-se, de forma geral, a diferentes subprodutos sólidos do tratamento de esgotos (ANDREOLI *et al.*, 2001b). Todos os processos biológicos de tratamento geram lodo, entretanto, as características deste subproduto variam de acordo com o tratamento utilizado. O lodo primário é gerado em decantadores primários, sendo constituído por sólidos sedimentáveis do esgoto bruto. O lodo biológico, ou secundário, por sua vez, é formado pela biomassa produzida na etapa biológica do tratamento. Outros tipos de lodo incluem o lodo misto, formado pela adição de lodo primário ao lodo secundário; e o lodo químico, gerado em sistemas de tratamento que incorporam uma etapa físico-química em seu fluxograma (VON SPERLING e GONÇALVES, 2001). Assim, é possível afirmar que o tipo e a quantidade de lodo produzido estão diretamente relacionados às tecnologias de tratamento adotadas em cada ETE.

No estado do Paraná, a Companhia Paranaense de Saneamento-SANEPAR adota sistemas de tratamento de esgotos contendo etapas de tratamento preliminar, isto é, gradeamento, desarenador e medidor de vazão, seguidas por uma etapa biológica de tratamento ou tratamento secundário, que pode ser aeróbia ou anaeróbia. Uma etapa de tratamento terciário é adicionada em algumas ETEs visando à remoção de nutrientes e patógenos específicos ou à remoção complementar de compostos não removidos completamente durante o tratamento secundário. Na Figura 2.1 é apresentado um fluxograma de uma ETE

contendo todas as etapas de tratamento.

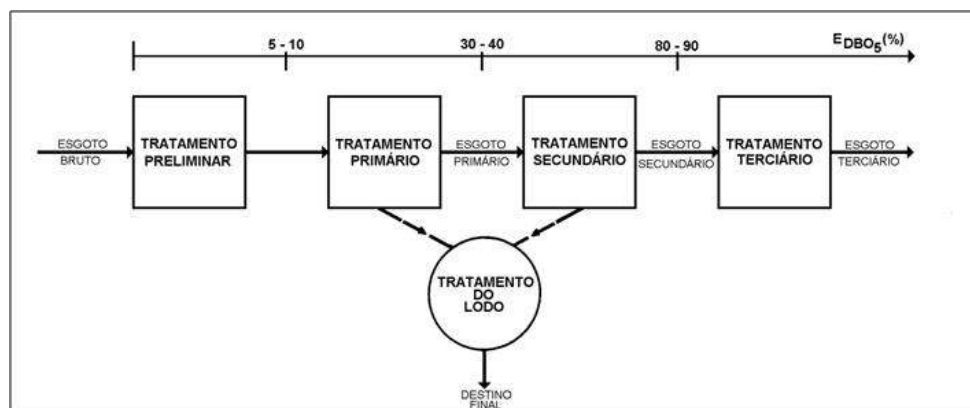


FIGURA 2.1 – FLUXOGRAMA TÍPICO DE UMA ETE COMPLETA

Nota: A barra superior indica a eficiência de remoção da matéria orgânica na forma de DBO (%) em cada etapa

FONTE: Aisse (2000)

Considerando-se o tratamento secundário aeróbio, a SANEPAR utiliza a tecnologia de lodos ativados com aeração prolongada. Esta tecnologia é restrita à ETE Belém, maior geradora de lodo na região metropolitana de Curitiba, com mais de  $1,56 \times 10^5 \text{ m}^3$  de lodo/ ano (2,5% de sólidos totais) produzidos (BITTENCOURT *et al.*, 2014). Apesar de similar ao sistema convencional, neste tipo de tecnologia a biomassa permanece mais tempo no sistema. Com isto, há menos DBO disponível para as bactérias, que irão se nutrir utilizando a matéria orgânica presente no seu material celular, em um processo denominado autólise. Em decorrência, o lodo excedente removido do sistema já se encontra estabilizado. Na Figura 2.2 é apresentado o fluxograma simplificado de uma ETE que utiliza o sistema de lodos ativados com aeração prolongada como tratamento secundário de esgoto doméstico.

Para o tratamento secundário anaeróbio de esgoto, as demais ETEs da SANEPAR utilizam a tecnologia UASB- *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*, ou reator anaeróbio de manta de lodo em fluxo ascendente. O sistema UASB consiste em um reator de fluxo ascendente, contendo uma zona de lodo cuja biomassa é responsável pela degradação biológica do esgoto. Esta tecnologia foi desenvolvida na Holanda na década de 1970 (LETTINGA *et al.*, 1980; LETTINGA e VINKEN, 1980). Estes sistemas apresentam eficiência média de remoção da matéria orgânica (DBO) entre 65% e 80% (SEGHEZZO *et al.*, 1998; CHERNICHARO, 2001; VON SPERLING *et al.*, 2001) e como principais vantagens o baixo consumo

energético e menor geração de lodo, quando comparados aos sistemas aeróbios de tratamento. Na Figura 2.3 é apresentado o fluxograma de uma ETE cuja tecnologia de tratamento secundário é um sistema UASB.

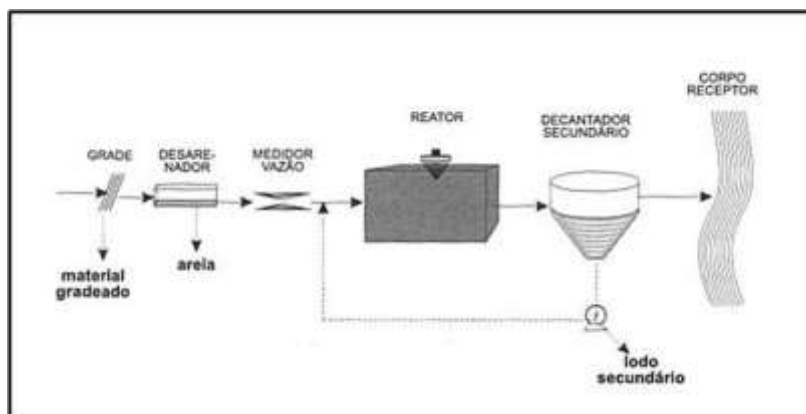


FIGURA 2.2 – FLUXOGRAMA DE UMA ETE COM TRATAMENTO SECUNDÁRIO POR LODOS ATIVADOS COM AERAÇÃO PROLONGADA

FONTE: Andreoli *et al.* (2001)

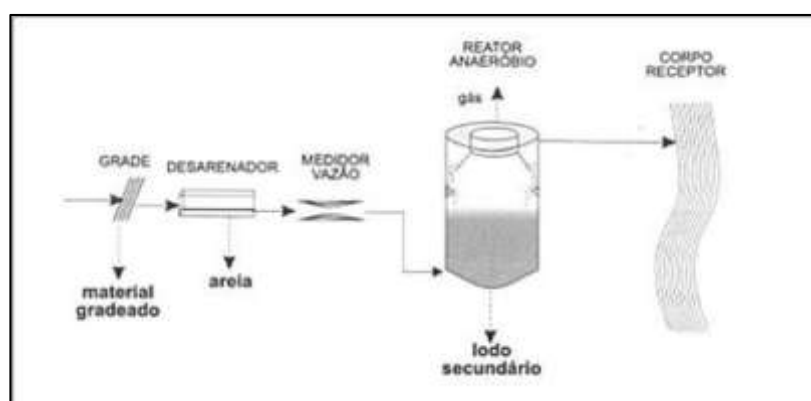


FIGURA 2.3 – FLUXOGRAMA DE UMA ETE COM TRATAMENTO SECUNDÁRIO POR REATOR UASB

FONTE: Andreoli *et al.* (2001)

Após sua geração, o lodo de esgoto deverá ser removido dos sistemas, quando assim o exigir, e seguir para as etapas de tratamento e acondicionamento até sua destinação final.

### 2.1.1 Tratamento e acondicionamento do lodo de esgoto

Os lodos gerados nas ETEs demandam monitoramento constante e tratamento adequado visando à concordância com as normas regulatórias para seus corretos acondicionamento e disposição final.

Uma vez removido dos sistemas de tratamento, o lodo deve inicialmente ser estabilizado via digestão aeróbia ou anaeróbia, caso não o tenha sido durante o tratamento secundário. Processos de estabilização do lodo visam acelerar a degradação da matéria orgânica presente neste subproduto, reduzindo odores e a atratividade de vetores, além de impedir que, se aplicado em solo, o lodo passe a competir pelos recursos naturais do meio, que são necessários aos processos de degradação de seus compostos orgânicos (HARTENSTEIN, 1981; FERNANDES *et al.*, 2005).

Depois de estabilizado, o lodo deve ser submetido a um processo de redução de umidade, que pode ser realizada utilizando-se centrífugas, leitos de secagem ou prensas desaguadoras, entre outros tipos de tecnologias (GONÇALVES *et al.*, 2001). Esta etapa de desaguamento visa a melhorias nas condições de manejo do lodo. Ao reduzir-se o volume deste subproduto, são reduzidos também os custos com seu transporte e com sua disposição final (AMUDA *et al.*, 2008).

Dependendo da destinação final do lodo, tem-se ainda uma etapa de higienização, cujo objetivo é a redução da sua patogenicidade. Uma forma bastante comum de higienização, adotada por muitas ETES no Brasil é a caleação ou estabilização alcalina, em que determinada quantidade de cal (CaO), em geral 30% a 50% da quantidade de sólidos totais no lodo, é adicionada ao lodo desaguado, visando aumentar seu pH para 12, o que reduz a viabilidade dos microrganismos presentes (FERNANDES *et al.*, 1996). O processo de higienização adotado pela SANEPAR é a estabilização alcalina prolongada (EAP) em que, após a elevação do pH, é seguido um período de cura de pelo menos 30 dias (PARANÁ, 2009). É importante salientar que, após qualquer tratamento de higienização, é necessário verificar a eficácia do processo utilizando-se metodologias para determinação e quantificação dos patógenos utilizados como indicadores de contaminação biológica no lodo de esgotos.

Após a estabilização, o desaguamento e a higienização, o lodo de esgoto deve ser acondicionado de forma apropriada. Assim, um dos pontos fundamentais dentro da infraestrutura necessária ao gerenciamento do lodo, é a estocagem. Esta etapa deve ser definida com cautela, pois são vários os fatores que podem exigir um tempo maior deste composto no pátio, a saber: a) tempo de maturação do lodo de esgoto, após processo de higienização como, por exemplo, a caleação;

b) tempo de resposta laboratorial dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, que serão utilizados para o adequado enquadramento do lodo; e c) tempo de espera para utilização do lodo em processos de beneficiamento, que vai variar de acordo com a demanda da atividade em questão (i.g. aplicação agrícola ou em áreas de recuperação). Na Figura 2.4 é apresentado o lodo disposto em pátio de estocagem na ETE Belém da SANEPAR, na cidade de Curitiba, Brasil.



FIGURA 2.4 – PÁTIO DE ESTOCAGEM DE LODO DE ESGOTO CALEADO-ETE BELÉM (SANEPAR), CURITIBA, BRASIL

FONTE: SANEPAR (2015)

De acordo com a SANEPAR, os pátios devem ser dimensionados para um tempo mínimo de estocagem de 90 a 120 dias (SANEPAR, 2011). É importante salientar que o tempo de resposta de análises tem um grande impacto neste tempo de espera, em especial a análise parasitológica, que leva em média 30 dias para emissão de laudo fornecendo a concentração de ovos viáveis de *Ascaris* no lodo avaliado.

Em relação aos custos, apesar da estrutura física dos pátios ser parte importante na infraestrutura das ETEs, seus custos parecem mais vinculados à disposição final do resíduo. Isto porque, o tempo de pátio vai depender diretamente do tipo de disposição final a que o lodo se destina. Como exemplo, aplicações no solo ou disposição em aterros sanitários, que dependem da disponibilidade de área para sua aplicação ou disposição, são mais dependentes

da estocagem, do que outras formas de disposição, como a incineração (MALINA, 1993; ANDREOLI *et al.*, 2001a).

Desta forma, considerando-se que:

i) dentre as alternativas de disposição final, o uso do lodo estabilizado e higienizado nos solos apresenta vantagens ambientais e econômicas, em relação às demais alternativas, como disposição em aterros e incineração (ANDREOLI *et al.*, 2001; PEGORINI *et al.*, 2003);

ii) o lodo a ser utilizado de forma benéfica na agricultura e demais solos deve apresentar sanidade adequada, expressa pela quantidade de patógenos abaixo do limite especificado pelas normas reguladoras (CONAMA, 2006); e

iii) o tempo e os custos de estocagem são tanto maiores quanto maior for o tempo necessário de manutenção do lodo no pátio, devido à espera dos resultados das análises de qualidade do lodo.

Assim, é possível concluir que metodologias que forneçam respostas analíticas dos parâmetros de qualidade avaliados, em tempos reduzidos, possibilitarão a também redução nos custos de manutenção do lodo de esgoto destinado à aplicação agrícola, nos pátios de estocagem do resíduo.

### **2.1.2 Definindo a estratégia adequada de gestão**

A implementação de um sistema adequado de gestão de lodo tem ganhado cada vez mais importância, devido ao aumento do volume gerado deste subproduto como resultado da ampliação das redes de tratamento de esgoto, principalmente nos países em desenvolvimento (ROBBINS *et al.*, 2012). Além disso, a crescente urbanização, juntamente com normas cada vez mais rigorosas para utilização ou eliminação do lodo, e a pressão da opinião pública, vêm forçando os geradores de lodo a reavaliar suas estratégias de gestão (POULSEN e HANSEN, 2003; SPINOSA *et al.*, 2011).

A gestão do lodo desempenha um papel importante em programas de saneamento, ajudando a reduzir os problemas de saúde e riscos associados a sua disposição final. Além disso, o tratamento e a disposição final adequados do lodo podem reduzir os custos operacionais de uma estação de tratamento de esgotos, considerando-se que o gerenciamento deste subproduto pode corresponder a até 60% do valor global de operação. Apesar disso, o planejamento e a execução de uma adequada destinação final do lodo têm sido frequentemente negligenciados,

principalmente nos países em desenvolvimento (JIMENEZ *et al.* 2004; ANDREOLI *et al.*, 2008).

Para a gestão adequada do lodo de esgoto é necessário o comprometimento de setores envolvidos no desenvolvimento e na aplicação dos regulamentos, bem como daqueles que estejam diretamente relacionados com a sua geração, tratamento, utilização ou eliminação (JIMENEZ *et al.*, 2004). Questões como a conformidade com as melhores práticas ambientais, padrões de saúde, uso de energia, efeito estufa, emissões gasosas, controle de odor e redução de volume devem ser levados em consideração ao se avaliar a sustentabilidade em longo prazo e a aceitação pública da gestão. Historicamente, a maior parte do lodo gerado era incinerada, enviada para aterros sanitários ou descartada em oceanos, com apenas uma pequena quantidade utilizada na agricultura (VASSEUR *et al.*, 1997). Atualmente, com a proibição da disposição no oceano e dada a capacidade limitada de aterros sanitários, grande parte do lodo é utilizada de forma benéfica, especialmente na agricultura, pastagens e recuperação de áreas degradadas (BITTENCOURT *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2012, BITTENCOURT *et al.*, 2014).

Diante do exposto, decisões relativas à escolha da melhor estratégia de gestão de lodos devem ser realizadas levando em consideração fatores econômicos, restrições impostas pela tecnologia disponível e pela legislação, além de fatores culturais e sociais (Figura 2.5). Questões políticas, bem como a estrutura dos setores público e privado também são fatores chave, que influenciam na tomada de decisão para a gestão mais adequada do lodo de esgoto (POULSEN e HANSEN, 2003; QUINTANA, 2006).

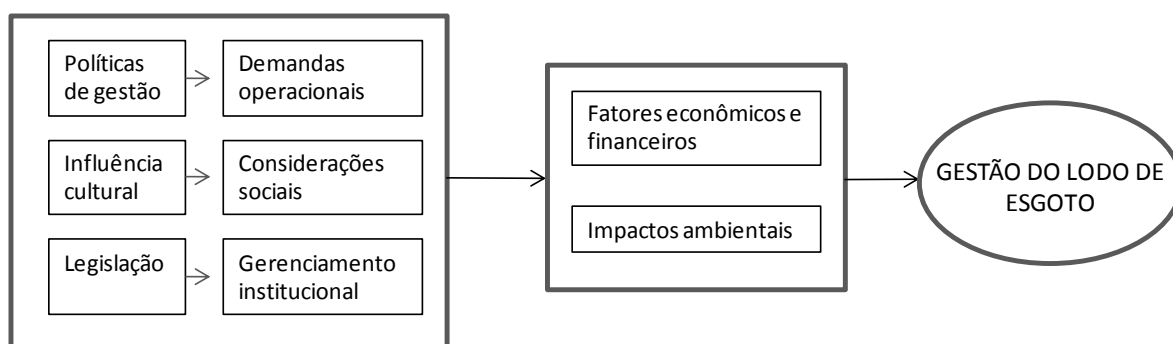


FIGURA 2.5 – FATORES A SEREM CONSIDERADOS PARA A SELEÇÃO DA MELHOR ESTRATÉGIA DE GESTÃO DE LODOS DE ESGOTO

FONTE: Adaptado de Poulsen e Hansen (2003)

O processo de tomada de decisão para a correta gestão do lodo pode ser auxiliado por técnicas quantitativas, aplicadas para modelar a realidade e obter a previsibilidade. É o caso da modelagem por equações estruturais (MEE), que fornece um caminho hipotético de relações lineares entre um conjunto de variáveis (GOSLING e GONÇALVES, 2003). Aplicada ao processo de gestão de lodo, a MEE pode indicar o grau de influência de cada fator na escolha da melhor estratégia de gestão, assim como pode fornecer respostas sobre como estes fatores relacionam-se e influenciam-se mutuamente, possibilitando a definição de uma estratégia de gestão de lodo adequada para cada cenário considerado. Entretanto, apesar do potencial de aplicação, não há na literatura, até o momento, estudos que associem ferramentas estatísticas como a MEE às tomadas de decisão no processo de gestão do lodo de esgoto.

## 2.2 SANIDADE DO LODO DE ESGOTO DOMÉSTICO

Conforme apresentado anteriormente, o uso agrícola do lodo de esgoto é uma forma benéfica de disposição final deste subproduto (MELO e MARQUES, 2000; ANDREOLI *et al.*, 2008; SING e AGRAWAI, 2008; BITTENCOURT *et al.*, 2009). Sua carga de nutrientes elevada enriquece os solos e possibilita a diminuição de custos com fertilizantes e estabilizantes nos cultivos (BERNAL *et al.*, 1998; GALDOS *et al.*, 2004; DE MARIA *et al.*, 2010). Além disso, a disposição no solo tem a vantagem de ser uma alternativa economicamente viável e com reduzido impacto ambiental (OLIVER *et al.*, 2005). Entretanto, é necessário que o lodo não prejudique a qualidade do solo ou das águas de superfície e subterrâneas e não acarrete riscos de contaminação, biológica ou química, aos seres vivos que possam entrar em contato com este composto (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2000; ARTHURSON, 2008).

Dessa forma, além de estável quimicamente, o lodo também deve apresentar condições de sanidade adequadas a fim de não oferecer risco de contaminação biológica ao meio (ANDREOLI *et al.*, 2001a; REILLY, 2001; CONAMA, 2006; ARTHURSON, 2008). Processos de higienização de lodo de esgoto incluem a compostagem (POURCHER *et al.*, 2005; CÔRREA *et al.*, 2007; COFIE *et al.*, 2009; ZHANG, 2011), caleação (CZECHOWSKI e MARCINKOWSKI, 2006; TAMANINI *et al.*, 2008; BITTENCOURT *et al.*, 2009) e tratamento térmico



(PITERINA *et al.*, 2010; RUBIO-LOZA e NOYOLA, 2010).

A Resolução CONAMA nº 375/ 2006 especifica, no Anexo I, processos de higienização de lodo que proporcionem: (a) redução significativa de patógenos, e (b) redução adicional de patógenos. No primeiro caso são estabelecidos, entre outros, os processos de digestão aeróbia e anaeróbia, ambos em temperatura de 20°C, por períodos mínimos de 40 e 60 dias, respectivamente, e a caleação, em que o pH do lodo deve ser elevado até 12 por um período mínimo de duas horas. Para a redução adicional de patógenos, em especial alguns ovos de helmintos, que apresentam alta resistência aos tratamentos definidos para redução significativa, existem opções de processos como a compostagem em leiras aeradas por 3 dias, com temperatura mínima de 55°C e tratamento térmico, pelo aquecimento do lodo de esgoto ou produto derivado líquido a 180°C durante um período de 30 minutos (CONAMA, 2006). Entretanto, para avaliar se um tratamento de desinfecção foi eficiente na remoção de patógenos, é necessário quantificar os organismos viáveis presentes em amostras do lodo, antes e após qualquer tipo de tratamento.

A Resolução CONAMA nº 375/ 2006 estabelece limites aos compostos tóxicos e principais tipos de patógenos encontrados em biossólidos, classificando-os em duas classes distintas: lodo *Classe A*, para aplicação em quaisquer culturas agrícolas e lodo *Classe B* cuja aplicação seria restrita aos cultivos de café, silvicultura e culturas para produção de fibras e óleos, desde que com aplicação mecanizada, em sulcos ou covas. Entretanto, esta Resolução também fixou o prazo de cinco anos, a partir da data da publicação, para que somente lodos enquadrados como Classe A possam ser aplicados em práticas agrícolas (Seção 3, artigo 11, parágrafo 1º). Atualmente, portanto, apenas lodos que se enquadrem nos parâmetros definidos para a Classe A podem ter qualquer aplicação agrícola, tornando-se prioritário o desenvolvimento de metodologias adequadas para a detecção e quantificação de organismos patogênicos neste subproduto. O Quadro 2.1 apresenta os valores diretivos para patógenos fixados pela Resolução CONAMA nº 375/ 2006 e aplicáveis a biossólidos gerados no Brasil.

Os grupos de patógenos que devem ser monitorados em amostras de lodo de esgoto são: vírus entéricos, principalmente adenovírus e enterovírus; coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*) e *Salmonella*, como representantes bacterianos das contaminações biológicas de origem fecal; e helmintos na forma de ovos

viáveis de *Ascaris*, ou seja, capazes de originar um indivíduo adulto em condições adequadas do meio (STRAUB *et al.*, 1993).

QUADRO 2.1 – CONCENTRAÇÕES MÁXIMAS DE PATÓGENOS PARA LODOS DE ESGOTO CLASSES A E B

Classe do lodo de esgoto ou derivado	Limite de concentração de patógenos
<b>A</b>	Coliformes Termotolerantes < $10^3$ NMP/ g ST Ovos viáveis de helmintos < 0, 25 ovos / g ST <i>Salmonella</i> - ausência em 10 gde ST Vírus < 0,25 UFP ou UFF / g ST
<b>B*</b>	Coliformes Termotolerantes < $10^6$ NMP/ g ST Ovos viáveis de helmintos < 10 ovos / g ST

Notas: NMP – Número Mais Provável; ST – Sólidos Totais; UFP – Unidade Formadora de Placa; UFF – Unidade Formadora de Foco; \*aplicação em práticas agrícolas não mais vigente

FONTE: CONAMA (2006)

Apesar de muitos patógenos serem encontrados em amostras de lodo, sua presença não indica, necessariamente, que exista risco de contaminação (LEWIS e GATTIE, 2002). O risco é função da dose infectante necessária para que aquele organismo possa gerar um quadro patogênico em um indivíduo. Por exemplo, a dose infectante mínima para *Cryptosporidium parvum* é de 1 a 100 oocistos, enquanto que para *Vibrio Cholerae* ou *Escherichia coli* este valor é de  $10^3$  organismos (MANDELL *et al.*, 2005).

Para helmintos, a dose infectante mínima é bastante baixa e o contato ou ingestão de um único ovo viável pode levar ao desenvolvimento da doença associada ao parasita (NAVARRO *et al.*, 2009). Assim, a baixa dose infectante, associada à estrutura resistente de seus ovos, faz com que os helmintos sejam o principal alvo das técnicas de higienização do lodo de esgoto. É fundamental, portanto, quantificar o número de ovos dos representantes deste grupo em amostras de lodo destinadas ao uso agrícola com elevadas acurácia e rapidez.

### 2.2.1 Ovos de helmintos em lodo de esgoto

Na área da Engenharia Sanitária, o conceito de helmintos encontra-se relacionado ao grupo de parasitas intestinais cujo hospedeiro definitivo é o homem. As doenças geradas por estes organismos são descritas como helmintíases e possuem abrangência global, apesar de serem mais frequentes em países em desenvolvimento (JIMENEZ e MAYA, 2007).

Helmintos são animais metazoários, acelomados ou pseudocelomados, com sexos separados ou hermafroditas. Apresentam-se em diversos tamanhos e formatos, variando desde organismos pequenos e foliáceos até cilíndricos e alongados (REY, 2008). O termo helminto, portanto, é de origem prática e significa verme parasita. Estes organismos encontram-se divididos entre os filos Platyhelminthes e Nematoda (agrupado dentro do superfilo Ecdysozoa) e, apesar de evolutivamente distantes, apresentam várias similaridades anatômicas e funcionais que refletem seu modo de vida em comum (WAKELIN, 1996).

O desenvolvimento dos helmintos segue três estádios principais, a saber: ovo, fase de larva ou juvenil e adulto, sendo que o número de fases larvais varia para cada espécie (PARKER *et al.*, 2003). Após a fecundação, os ovos são eliminados do corpo do hospedeiro, geralmente com as fezes. Caso encontrem condições propícias no meio, seja pela ingestão ou contato com um hospedeiro intermediário ou recursos adequados para realizar a embriogênese no solo (no caso dos geohelmintos), o ciclo recomeça. Muitas vezes, entretanto, as condições não são ideais e os ovos são mantidos viáveis em fase latente ou de dormência, na qual a resistência estrutural será essencial (PERRY, 1989).

Em relação ao saneamento ambiental, as principais características de interesse dos helmintos estão relacionadas à estrutura dos seus ovos. Os parasitas adultos também podem ser eliminados com as fezes, entretanto, não são capazes de sobreviver fora do hospedeiro. Por outro lado, os ovos destes parasitas são formados por estruturas bastante resistentes que se mantêm viáveis mesmo quando submetidos a processos severos de dessecação ou à ação de um forte agente químico (GHIGLIETTI *et al.*, 1997; PERRY, 1999).

A elevada resistência dos ovos de helmintos a fatores externos adversos pode ser atribuída à espessa casca ou envoltório presente na maior parte dos representantes desse grupo. Como exemplo, a casca dos helmintos pertencentes

ao gênero *Ascaris* é formada por três revestimentos principais: a) camada externa, irregular, de constituição lipoproteica e recoberta por mucopolissacarídeos; b) membrana quitinosa, intermediária e de espessura variável; e c) membrana interna de constituição lipídica (WHARTON, 1983). A sobreposição destas camadas forma uma estrutura compacta capaz de resistir às situações de estresse físico (calor), químico (oxidantes, detergentes) ou biológico (proteases), durante as etapas de desinfecção do lodo (MASSARA *et al.*, 2003; GUZMAN *et al.*, 2007).

Entre os helmintos presentes no lodo de esgoto, o nematódeo *Ascaris* é o mais refratário aos processos de tratamento e sua inativação ou permanência no material tratado pode servir de indicador da eficiência do processo (MAYA *et al.*, 2010).

### 2.3 *Ascaris*

O gênero *Ascaris* abrange parasitas importantes para o controle e avaliação da eficiência de técnicas de higienização de lodo de esgoto. Isto porque, além de terem co-evoluído com o homem, sendo facilmente encontrados em qualquer região povoada do planeta (LELES, 2010; DOLD e HOLLAND, 2011), os ovos de *Ascaris* são extremamente resistentes aos processos de desinfecção do lodo (MASSARA *et al.*, 2003; MAYA *et al.*, 2010). Além disso, podem ser encontrados em grandes quantidades, dada a capacidade de uma fêmea adulta em depositar mais de 200.000 ovos por dia, eliminados com as fezes do hospedeiro (SINNIAH, 1982).

Quando em contato com o solo, os ovos de *Ascaris* iniciam seu desenvolvimento embrionário até a formação de uma larva. O fato desse parasita necessitar de uma etapa de desenvolvimento no solo classifica-o como um geohelminto, assim como espécies como *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale* (PEARSON, 2002).

Em condições de temperatura, umidade e oxigenação adequadas a larva de *Ascaris lumbricoides* realiza duas mudas ou ecdises, passando da fase inicial (L1), para a fase intermediária (L2) e para a terceira e última forma larval atingida no solo (L3), sendo a única capaz de infectar o hospedeiro. A larva L3 pode manter-se infectante no ambiente por muitos anos, pois é capaz de reduzir seu metabolismo até o mínimo necessário (REY, 2008). Em *Ascaris suum*, a larva infectante é L2, realizando apenas uma muda durante sua fase de vida fora do

hospedeiro (MURRELL *et al.*, 1997). Outros autores, entretanto, afirmam que pode ocorrer uma segunda muda ainda dentro do ovo de *A. suum*, sendo esta forma larval L3 responsável pela infecção dos hospedeiros (MAUNG *et al.*, 1978; GEENEN *et al.*, 1999).

Uma vez ingerida, a larva vai eclodir do ovo devido aos estímulos fornecidos pelo hospedeiro e migrar pelo sistema circulatório até o pulmão, na denominada migração pulmonar. Ao final rompe o vaso, penetra na luz do alvéolo e sofre a terceira muda (L4). Esta forma larval segue pela árvore respiratória até a cavidade oral, onde é novamente deglutida, seguindo mais uma vez para o intestino delgado, onde ocorre a diferenciação sexual. Cerca de um mês após a cópula, os ovos são eliminados com as fezes e o ciclo recomeça (REY, 2008).

O ciclo de vida de *Ascaris* no hospedeiro e a patologia causada pelo parasita são amplamente estudados e descritos na literatura. Entretanto, informações a respeito do seu desenvolvimento embrionário inicial e ciclo de vida fora do hospedeiro ainda são bastante limitadas (CRUZ *et al.*, 2012).

### **2.3.1 *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum***

O gênero *Ascaris* compreende duas espécies, morfológica e geneticamente muito similares (LELES *et al.*, 2012): *Ascaris lumbricoides*, parasita do homem, e *Ascaris suum*, parasita de suínos (ANSEL e THIBAU, 1973). A classificação taxonômica de ambas as espécies está definida no Quadro 2.2.

Apesar da proximidade genética entre as espécies, acredita-se que a infecção cruzada dos parasitas seja baixa em condições naturais, principalmente em regiões endêmicas (PENG *et al.*, 2005; PENG *et al.*, 2007). Entretanto, estudos recentes apontam para a possibilidade de alguns genótipos de *Ascaris suum* serem capazes de parasitar humanos (NEJSUM *et al.*, 2005; LELES *et al.*, 2009; ARIZONO *et al.*, 2010).

Os resultados de um estudo clínico realizado na Dinamarca por Nejsum e colaboradores (2005), em que regiões polimórficas do genoma de parasitas foram analisadas, permitiram concluir que todos os casos de infecção causada por *Ascaris* na amostra selecionada eram devido à ingestão de ovos de *A. suum*. A conclusão do estudo foi que a ascaríase na região pode ser caracterizada como uma zoonose contraída a partir do contato com esterco dos suínos.

QUADRO 2.2 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS ESPÉCIES *Ascaris suum* e *Ascaris lumbricoides*

<b>Reino</b>	<b>Animalia</b>
<b>Superfilo</b>	Ecdysozoa
<b>Filo</b>	<b>Nematoda</b>
<b>Classe</b>	Secernenthea
<b>Ordem</b>	<b>Ascaridida</b>
<b>Família</b>	Ascarididae
<b>Gênero</b>	<b><i>Ascaris</i></b>
<b>Espécies</b>	<i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Ascaris suum</i>

Arizono e colaboradores (2010), em estudo realizado no Japão, isolaram o DNA dos parasitas obtidos de pacientes que apresentavam sintomas de ascaríase. Os pesquisadores encontraram nove genótipos diferentes. Seis deles correspondentes a *A. lumbricoides* e os restantes a *A. suum*. Apesar da baixa prevalência encontrada desses genótipos nas amostras do estudo, os resultados indicam a possibilidade de que parte dos casos de ascaríase observados na região de estudo seja causada pela infecção por *A. suum*.

Apesar dos resultados encontrados serem oriundos de pesquisas realizadas em países desenvolvidos (LORD e BULLOCK, 1982; ANDERSON, 1995) e, em contrapartida, estudos realizados em regiões endêmicas de países em desenvolvimento como Guatemala (ANDERSON *et al.*, 1993) e China (PENG *et al.*, 1998) não terem encontrado as mesmas evidências de infecção cruzada, não se pode descartar a possibilidade de que parte dos ovos encontrados em amostras de lodo no Brasil, principalmente em regiões rurais, possa pertencer a *A. suum*. Assim sendo, metodologias de detecção dos parasitas devem apresentar sensibilidade suficiente para detectar ambas as espécies quando presentes nas amostras analisadas.

### 2.3.2 Desenvolvimento Embrionário de *Ascaris*

Os ovos fecundados de *Ascaris* que são eliminados pelo hospedeiro contêm apenas um blastômero ou célula germinativa. Conforme já apresentado, as divisões celulares que caracterizam a embriogênese do parasita só vão ocorrer no

solo, em condições adequadas de oxigenação, temperatura e umidade (REY, 2008).

As etapas do desenvolvimento embriogênico da ordem Ascaridida, apesar de ainda pouco elucidadas, já foram discutidas em 1887 pelo embriologista alemão Theodor Boveri durante estudos com os cromossomos de *Ascaris megalocephala* (atualmente *Parascaris equorum*) (BOVARI, 1887; TOBLER, 1986). Os embriões de *P. equorum* funcionaram como um ótimo modelo para o estudo embrionário do grupo, pois permitiram a descoberta de uma importante característica embriogênica presente em alguns nematódeos, entre eles as espécies de *Ascaris*: a eliminação de parte da cromatina existente nas células iniciais do embrião (blastômeros) que darão origem às células somáticas do indivíduo adulto (MORITZ e ROTH, 1976; GOLDSTEIN e STRAUS, 1978; MÜLLER *et al.*, 1991; MÜLLER *et al.*, 1996; GILBERT, 2010).

O processo de redução da cromatina, também conhecido como diminuição cromossômica, não é observado em todos os nematódeos; na verdade apenas dez espécies do grupo apresentam algum mecanismo similar ao descrito por Boveri, sendo a maioria pertencente à família Ascarididae (MÜLLER e TOBLER, 2000). O processo envolve a eliminação de uma parte do DNA presente nos cromossomos de algumas células do parasita durante sua fase embrionária. Este “processamento” do material genético parece estar vinculado a mecanismos de regulação gênica envolvidos na diferenciação das células germinais em células somáticas (ETTER *et al.*, 1991; ETTER *et al.*, 1994; MÜLLER *et al.*, 1996). Cerca de 85% do DNA nuclear total de *Parascaris* são removidos após a segunda divisão celular do embrião (GODAY *et al.*, 1992). Para *A. suum* e *A. lumbricoides* a fração eliminada é de 25%, porém não antes da terceira divisão celular (MORITZ e ROTH, 1976; GOLDSTEIN e STRAUSS, 1978; MÜLLER *et al.*, 1996).

A eliminação da cromatina nas espécies de *Ascaris* vai ocorrer em regiões específicas no cromossomo, porém pouco se sabe sobre o mecanismo de quebra do cromossomo nestas regiões ou como elas são selecionadas (GILBERT, 2010). Após a quebra, o DNA presente entre o sítio de clivagem e a extremidade do cromossomo (telômero) é degradado e múltiplas unidades da sequência telomérica TTAGGC são adicionadas à região da deleção, provavelmente devido à ação da enzima telomerase (JENTSCH *et al.*, 2002).

Os segmentos de DNA eliminados durante a diminuição cromossômica são

formados, majoritariamente, por sequências repetitivas e não codificadoras (MÜLLER *et al.*, 1991). Entretanto, foram identificados dois genes de cópia única em *Ascaris* spp. que também são removidos durante o processo (ETTER *et al.*, 1991; ETTER *et al.*, 1994; SPICHER *et al.*, 1992). Esta descoberta reforçou a hipótese de que este mecanismo esteja vinculado a processos de regulação gênica (GILBERT, 2010).

Os genes removidos das células pré-somáticas do embrião de *Ascaris* foram denominados de *fert1* e *alep1*. O primeiro é ativado logo após a fertilização e é responsável por uma série de transcritos de RNA, provavelmente com função estrutural (SPICHER *et al.*, 1994). O gene *alep1* está associado à expressão de uma proteína análoga à proteína ribossomal S19 de eucariotos, denominada de ALEP1 (do inglês *Ascaris lumbricoides Eliminated Protein*) (ETTER *et al.*, 1991; ETTER *et al.*, 1994). Proteínas ribossomais são responsáveis pela estabilidade estrutural das subunidades dos ribossomos e, portanto, devem apresentar expressão constitutiva em todas as células de um organismo. Entretanto, a proteína ALEP1 só vai ser expressa nas fases iniciais do desenvolvimento do embrião ou nas células germinativas restantes, devido ao mecanismo de remoção do seu gene codificador. Etter e colaboradores (1994) identificaram um segundo gene, ativado apenas após a eliminação de *alep1*, que codifica para outra proteína S19 que fará parte da estrutura dos ribossomos presentes nas células pré-somáticas. Esta heterogeneidade ribossomal parece estar relacionada à diferenciação celular do parasita durante a passagem da fase embrionária para a fase larval (BLAXTER, 2003).

As características atípicas da embriogênese de *Ascaris*, associadas à grande quantidade de transcritos nas etapas iniciais de seu desenvolvimento (CLEAVINGER *et al.*, 1989) podem servir de base para a criação de uma ferramenta molecular adequada ao diagnóstico de fases específicas do parasita.

## 2.4 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE HELMINTOS EM LODO DE ESGOTO

Os primeiros protocolos para quantificar ovos viáveis de helmintos em lodo de esgoto foram baseados em métodos de isolamento dos ovos a partir de amostras fecais (FAUST *et al.*, 1939; ALLEN e RIDLEY, 1970). Entretanto, a



elevada diluição do lodo exigiu a adaptação destes métodos para amostras contendo baixas concentrações dos parasitas (STEER *et al.*, 1974). Foi necessário, portanto, desenvolver novas metodologias, capazes de processar e avaliar grandes volumes de material e concentrar os ovos existentes nas amostras, reduzindo os componentes indesejáveis do lodo a uma quantidade mínima (SATCHELL, 1986).

Desde as primeiras tentativas para purificação de ovos de parasitas de amostras de lodo (STEER *et al.*, 1976; MEYER *et al.*, 1978; REIMERS *et al.*, 1981) até os dias de hoje, diferentes métodos foram desenvolvidos (HUYARD *et al.*, 2000; BEAN e BRABANTS, 2001; USEPA, 2003) e, apesar de utilizarem materiais e reagentes diversos, são constituídos basicamente por quatro etapas: (i) amostragem do lodo; (ii) separação dos ovos do material indesejado no lodo e aumento da sua concentração na amostra; (iii) incubação em temperatura e oxigenação adequadas para o desenvolvimento da larva, e (iv) análise e quantificação de viáveis, geralmente por análise microscópica (NELSON e DARBY 2001).

Em cada uma destas etapas, variações nos reagentes e materiais utilizados caracterizam cada um dos métodos de quantificação encontrados na literatura. Estas diferentes operações são responsáveis pela acurácia e precisão das metodologias e cada uma delas deve ser avaliada, visando à maior recuperação de ovos viáveis das amostras (BOWMAN *et al.* 2003).

#### **2.4.1 Amostragem**

A etapa de amostragem de lodo de esgoto deve receber atenção especial durante o desenvolvimento de um protocolo. Amostras de lodo não representativas da real diversidade do meio desqualificam os resultados posteriores obtidos por um método (USEPA, 2003). De acordo com a USEPA, em seu Regulamento *Sampling Procedures and Protocols for the National Sewage Sludge Survey* (1988), a forma mais representativa de coletar amostras de lodo é utilizando-se a técnica de *grab sampling*, isto é, coletar diretamente após a etapa de interesse durante a operação da estação. Ou seja, se o interesse é em lodo desaguado, uma amostra representativa seria idealmente obtida na saída do equipamento utilizado para remoção de água, seja uma prensa desaguadora ou uma centrífuga,

como exemplo. De acordo com o Regulamento, a homogeneidade da amostra é garantida devido aos elevados tempos de detenção do lodo na estação, o que reduz a variabilidade das características deste subproduto.

Além da qualidade do lodo amostrado, é importante considerar também a quantidade de lodo a ser utilizada durante os ensaios de quantificação. A quantidade de material utilizado nos ensaios está diretamente relacionada ao nível de detecção a ser obtido (BOWMAN *et al.*, 2003). Na regulamentação da USEPA (2003), o limite de ovos de helmintos estabelecido para lodo a ser aplicado na agricultura ou em pastagens (biossólidos Classe A) é de 1 ovo/ 4 g de sólidos totais (ST). Dessa forma, para que o monitoramento seja adequado, o tamanho da amostra deve possibilitar que se atinja o limite de detecção. Entretanto, amostras muito grandes podem resultar em menores taxas de recuperação (BEAN e BRABANTS, 2001). Isto porque elevadas quantidades de sólidos interferem na eficiência das diferentes operações da fase de purificação dos ovos (BOWMAN *et al.*, 2003).

Em geral, o volume de amostra ensaiado deve conter entre 5 g (REIMERS *et al.*, 1989) e 50 g (USEPA, 2003) de sólidos totais. Entretanto, durante o desenvolvimento de nova metodologia, este valor deve ser estabelecido pelo pesquisador, com base na acurácia e na precisão obtidas para ensaios contendo diferentes concentrações de sólidos.

#### **2.4.2 Separação e concentração dos ovos de *Ascaris***

Em geral, os métodos para determinação de ovos viáveis de helmintos utilizam várias operações sequenciais como lavagem ou dessorção dos ovos da matriz do lodo, sedimentação, filtração, flotação, extração, entre outros. Estes passos são utilizados para garantir a separação adequada dos ovos dos demais contaminantes, facilitando a identificação e contagem em etapa posterior. Na Figura 2.6 é apresentada uma representação esquemática da sequência de operações necessárias para a purificação e quantificação de ovos de helmintos em amostras de lodo.

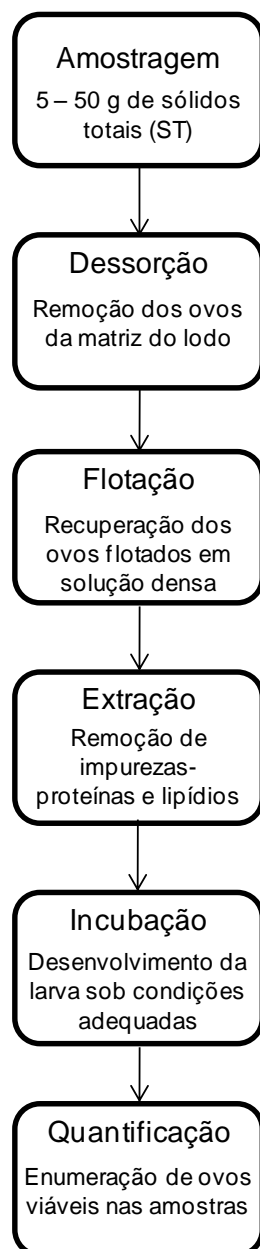


FIGURA 2.6- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA GERAL DAS PRINCIPAIS ETAPAS PARA DETERMINAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE HELMINTOS EM AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO

FONTE: O autor (2013)

#### 2.4.2.1 Dessorção

A etapa inicial do processo de purificação e concentração dos ovos de helmintos está relacionada à dessorção destes ovos da matriz de compostos presentes no lodo (REIMERS *et al.*, 1989; NELSON e DARBY, 2001). As membranas de revestimento dos ovos destes parasitas associam-se aos

compostos orgânicos presentes no resíduo, como ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e polissacarídeos (GASPARD *et al.*, 1994). Presos no interior da matriz orgânica do lodo, os ovos tornam-se refratários às etapas de sedimentação diferencial e de flotação (MEYER *et al.*, 1974; GASPARD *et al.*, 1994). Portanto, é necessário remover estas matrizes de contaminantes para que os ovos possam ser isolados adequadamente.

O uso de proteínas, como a lactoalbumina pode ser efetivo no processo de dessorção (O'DONNELL *et al.*, 1984) e até mesmo água morna pode ser utilizada na lavagem das amostras (YANKO 1987). Entretanto, a lavagem das amostras com soluções de surfactantes é a principal estratégia para remover os ovos da matriz do lodo (REIMERS *et al.*, 1989; GASPARD *et al.*, 1996; BOWMAN *et al.*, 2003). Para reduzir a fração mais grosseira dos sólidos e facilitar o contato entre a solução de lavagem e as partículas do lodo pode-se realizar uma etapa de lise mecânica anteriormente à lavagem (REIMERS *et al.*, 1989).

Os reagentes surfactantes mais utilizados são os detergentes não iônicos, como por exemplo, Triton<sup>®</sup>, Tween<sup>®</sup> 80 e 7X<sup>®</sup> (BOWMAN *et al.*, 2003). O uso de baixas concentrações desses compostos pode ser efetivo na dessorção dos ovos da matriz do lodo. Gaspard e colaboradores (1996) utilizando 0,01% w/v de dodecilsulfato de sódio (SDS) na fase de dessorção, observaram que 88% a 93% dos ovos de *Ascaris suum* permaneceram viáveis. No entanto, a lavagem do lodo com altas concentrações de detergente pode ter um efeito tóxico sobre os ovos de helmintos, o que compromete a integridade da membrana do parasita (JASKOSKI 1954). Satchwell (1986) avaliou o uso de três detergentes, cloreto de cetilpiridínio, SDS e Nonidet P40<sup>®</sup>, a uma concentração de 0,8% w/v em uma etapa de lavagem antes da filtração. De acordo com os resultados deste estudo, aproximadamente 31% dos ovos de *Taenia* não foram recuperados após a lavagem.

Assim como a concentração, a escolha adequada do detergente é um fator determinante para a recuperação dos ovos dos parasitas. Bowman e colaboradores (2003) avaliaram a ação dos detergentes Triton<sup>®</sup>, Tween<sup>®</sup> 80 e Linbro<sup>®</sup> 7X durante ensaios de concentração e recuperação de ovos de *Ascaris*. Estes pesquisadores concluíram que, quando utilizado o detergente 7X, o método apresenta maior taxa de recuperação dos ovos do parasita em relação aos demais detergentes utilizados. Além disso, esse reagente não formou precipitado quando

em contato com as soluções de sais utilizadas durante a etapa de flotação (BOWMAN *et al.* 2003).

#### 2.4.2.2 Sedimentação e peneiramento

Após a etapa de dessorção, é importante recuperar os ovos presentes na solução e remover os resíduos grosseiros de lodo que interferem na concentração e purificação do material. Em geral, etapas de sedimentação seguidas de peneiramento são eficazes nesta fase (MEYER *et al.*, 1974).

Para permitir que os sólidos sedimentem após a lavagem das amostras, a solução homogeneizada é colocada em repouso por períodos que variam de 4 até 12 horas ou mais, dependendo das características do material (YANKO, 1987; REIMERS *et al.*, 1989; USEPA, 2003). Com o objetivo de aumentar a eficiência da dessorção, após remover o sobrenadante, novas etapas de lavagem seguidas de sedimentação podem ser realizadas (USEPA, 2003).

Ao final das etapas de sedimentação, novo volume da solução de lavagem é adicionado ao resíduo obtido. Esta mistura conterá os ovos, juntamente com uma grande quantidade de resíduos do lodo. Neste estágio, o uso de peneiras de malha grossa (20 a 50 *mesh*) garante a remoção da fração mais grosseira de sólidos, reduzindo os resíduos interferentes na etapa da flotação (BLACK *et al.*, 1982).

#### 2.4.2.3 Flotação

Após sedimentar e peneirar a amostra, a recuperação dos ovos é realizada, em geral, por flotação. O princípio da flotação baseia-se na diferença de gravidade específica (SG) entre os ovos e uma solução de flotação de alta densidade (DRYDEN *et al.*, 2005). Soluções comumente utilizadas incluem sacarose (FITZERALD e FOX, 1978), sulfato de zinco (YANKO, 1987), sulfato de magnésio (REIMERS *et al.*, 1989; BOWMAN *et al.*, 2003) e cloreto de sódio (GASPARD *et al.*, 1996).

Para que ocorra a flotação, a densidade da solução deve ser maior do que a densidade dos ovos. Para a maioria dos ovos de parasitas a gravidade específica encontra-se entre 1,05 e 1,23 (DAVID e LINDQUIST, 1982; DRYEN *et al.*, 2005). Assim, as soluções mais utilizadas apresentam valores de SG de 1,18

(NaCl), 1,20 (ZnSO<sub>4</sub> e MgSO<sub>4</sub>) e 1,30 (sacarose). Combinações desses sais produzem soluções com densidades diferenciadas como é o caso das soluções de cloreto de sódio e cloreto de zinco (SG 1,35) e nitrato de sódio e tiosulfato de sódio (SG 1,45) (CRINGOLI *et al.*, 2004).

A escolha da solução de flotação mais adequada a determinado protocolo depende tanto das etapas anteriores de processamento como da espécie do parasita que se deseja recuperar. Algumas soluções salinas, por exemplo, tendem a precipitar na presença de detergentes, como é o caso de NaCl (BOWMAN *et al.*, 2003). Outras, como a sacarose, são viscosas e exigem maior tempo de centrifugação; entretanto, recuperam até mesmo os ovos mais pesados, como os de *Taenia* spp. (DAVID e LINDQUIST, 1982). Além disso, dependendo do floculante escolhido, devem ser evitados longos períodos de contato entre as soluções e os ovos, pois alguns desses sais podem inibir o desenvolvimento embrionário do parasita (SMITH, 1991; GASPARD *et al.*, 1996).

Após a adição da solução de flotação no sedimento contendo os ovos, uma etapa de centrifugação auxilia a decantação dos resíduos de lodo ainda presentes, além de permitir que os ovos flutuem mais rapidamente na superfície da solução (DRYEN *et al.*, 2005). O tempo de centrifugação, assim como a composição do lodo, influencia na eficiência do processo; as condições de operação adotadas em um protocolo, portanto, devem ser avaliadas visando aperfeiçoar a recuperação dos ovos para cada tipo de amostra (NUNES *et al.*, 1994).

#### 2.4.2.4 Extração

A etapa da extração aparece em diversos protocolos de quantificação de ovos de helmintos e tem o objetivo de remover contaminantes proteicos e lipídicos dos ovos obtidos após a floculação (USEPA, 2003).

Utilizando-se reagentes lipofílicos e hidrofílicos, a amostra é particionada em duas fases, leve e pesada, sendo que, na fase hidrofílica, os ovos dos parasitas são concentrados no fundo dos tubos (NELSON e DARBY, 2001). Entre as soluções lipofílicas mais utilizadas encontram-se o éter dietílico e o acetato de etila (RUDE *et al.*, 1986), enquanto na fase hidrofílica é comum o uso de etanol acidificado e acetato (USEPA, 1992).

Apesar de eficazes na remoção de contaminantes, alguns desses reagentes

podem ser prejudiciais à manutenção da viabilidade dos ovos de helmintos. Originalmente apresentada por Allen and Ridley (1970) como uma técnica para purificar ovos de parasitas em amostras de fezes, a extração com formaldeído-etanol foi utilizada por Satchwell (1986) durante a etapa de concentração dos ovos em amostras de lodo de esgoto. A etapa de extração consistia em remover os contaminantes com o uso de solução salina de formol 40% seguida de solução de éter dietílico. Entretanto, o método não garantiu a recuperação dos ovos inoculados nas amostras, e 95% deles foram perdidos durante esta etapa de extração (SATCHWELL, 1986).

Nelson e Darby (2001) adicionaram reagentes comumente utilizados durante a etapa de extração em soluções contendo concentrações conhecidas de ovos de *A. suum*. Após 1 hora de exposição, a solução contendo álcool acidificado foi a que apresentou a menor quantidade de ovos viáveis recuperados (52,2%). Efeito sinérgico foi observado ao se misturar solução de álcool acidificado com éter dietílico ou com acetato de etila. Nestes casos, a recuperação observada foi igual a 26,5% e 4%, respectivamente. Além da perda da viabilidade, o uso de reagentes de extração pode levar à baixa recuperação dos ovos das amostras, que muitas vezes são removidos juntamente com a fase lipofílica ou destruídos pela ação dos reagentes, impossibilitando sua identificação pela análise microscópica (NELSON e DARBY, 2001).

A redução no uso de compostos tóxicos durante a etapa de extração dos ovos nas amostras de lodo é uma preocupação dos protocolos adaptados para esse tipo de análise. Almeida e colaboradores adaptaram o protocolo de extração definido por Ritchie (1948) para amostras clínicas de fezes, substituindo o éter utilizado durante o passo de extração por água estéril saponificada, reagente lipofílico menos tóxico. No entanto, a recuperação de ovos das amostras foi 80% menos eficaz quando comparada com o protocolo original (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Uma alternativa à extração é uma nova filtração utilizando-se peneiras com aberturas capazes de reter os ovos ao mesmo tempo em que permitem a remoção de proteínas, lipídeos e outras moléculas contaminantes (USEPA 2003). Nelson e Darby (2001) compararam dois métodos de extração dos ovos de helmintos presentes em amostras de lodo. No primeiro método foram utilizadas soluções de álcool acidificado e éter dietílico para a remoção dos contaminantes, enquanto no segundo foram utilizadas apenas peneiras. A recuperação dos ovos no método

que utilizou os reagentes químicos foi menor, atingindo o valor máximo de recuperação de 34% contra o percentual de 64% observado no método físico de purificação dos ovos.

### 2.4.3 Incubação

Uma vez concentrados, os ovos de helmintos são incubados visando ao desenvolvimento da larva infectante (L3) dentro dos ovos viáveis (BOISVENUE *et al.*, 1990). A etapa de incubação é fundamental, pois a larva só é capaz de se desenvolver em um ambiente que apresente condições de temperatura e oxigenação adequadas (PEARSON, 2002). Além disso, a composição do meio em que os ovos serão incubados também influenciará o desenvolvimento larval do parasita (CRUZ *et al.*, 2012).

A temperatura de incubação é um dos fatores que mais influenciam o tempo de desenvolvimento do embrião dentro do ovo (ARENE, 1986). De maneira geral, temperaturas mais elevadas aceleram o desenvolvimento dos ovos, enquanto que em temperaturas mais baixas o tempo de incubação necessário para o desenvolvimento larval é maior (ARENE, 1986; CRUZ *et al.*, 2012). Ovos viáveis incubados em temperaturas de 20°C levam, em média, 17 dias para atingir a fase L1 (GEENEN *et al.*, 1999); em temperaturas de 28°C esse tempo é reduzido para 12 dias (CRUZ *et al.* 2012).

Em relação aos meios de incubação, soluções contendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N (YANKO, 1987) e formalina nas concentrações 0,5% (REIMERS *et al.*, 1989) e 1% (OKSANEN *et al.*, 1990) são bastante utilizadas. Estas soluções têm ação antimicrobiana e evitam o crescimento de fungos e outros organismos capazes de interferir no desenvolvimento embrionário do parasita (CRUZ *et al.*, 2012). Outras soluções incluem água destilada (OKSANEN *et al.*, 1990) ou ainda meios enriquecidos com nutrientes (GASPARD *et al.*, 1996).

É importante que amostras controle de ovos de parasita, em geral *Ascaris suum*, sejam incubadas simultaneamente aos ovos recuperados do lodo; desta forma quando a maior parte do controle estiver embrionado as amostras estarão prontas para contagem (USEPA, 2003).



#### 2.4.4 Determinação e quantificação de ovos viáveis

Ao final do período de incubação, a quantidade de ovos viáveis presentes nas amostras deve ser mensurada. A forma de quantificação mais aplicada nas diferentes metodologias é a contagem em microscópio óptico (REIMERS *et al.*, 1981; YANKO, 1987; REIMERS *et al.*, 1989; GASPARD *et al.*, 1996; BOWMAN *et al.*, 2003), entretanto, tentativas de determinação do número de ovos viáveis utilizando mecanismos moleculares já foram descritas (PECSON *et al.*, 2007). De qualquer forma, esta é uma etapa crítica do método, pois o número de ovos viáveis encontrados é uma resposta direta da eficiência dos processos de desinfecção do lodo, além de ser utilizado como parâmetro na escolha da destinação mais adequada desse resíduo (USEPA, 2003).

A contagem dos ovos em microscópio óptico é uma técnica que exige acuidade visual do analista, pois a presença de interferentes à leitura, como celulose, grãos de pólen e leveduras pode gerar falsos positivos (MOODLEY *et al.*, 2008).

Em geral a leitura é feita em uma câmara Sedgwick-Rafter, que apresenta dimensões de 50 x 20 x 1 mm e capacidade para 1 mL de solução. Como a análise dos ovos é realizada em pequeno aumento (40X ou 100X), a câmara fornece razoável reprodutibilidade aos ensaios (WOELKERLING *et al.*, 1976).

Durante a contagem, o analista deve obter o número total de ovos do helminto de interesse e determinar quantos desses abrigam uma fase larval. No caso de *Ascaris*, são reportadas as quantidades de ovos não embrionados e de ovos nas fases larvais (USEPA, 2003). Dessa forma, o número de ovos viáveis é fornecido como a quantidade de ovos larvados por grama de sólidos totais.

Ainda em relação a *Ascaris*, na literatura são relatadas seis fases de desenvolvimento do parasita observadas: ovo (uma célula), quatro fases larvais e adulto, sendo que, para ser considerado viável, o ovo observado em microscópio óptico deve abrigar uma larva formada (Figura 2.7) (BOWMAN *et al.*, 2003; USEPA 2003). Entretanto, Cruz e colaboradores (2012) observaram oito estágios intermediários de desenvolvimento entre a fase de ovo e a primeira fase larval (duas, três e quatro células, mórula, mórula tardia, blástula e gástrula). De acordo com os resultados obtidos pelos pesquisadores, estes estágios são potencialmente indicativos da viabilidade dos ovos e não podem ser

desconsiderados durante a contagem, com o risco de subestimar o número real de organismos viáveis na amostra (CRUZ *et al.*, 2012).



FIGURA 2.7 – FOTOMICROGRAFIA DE OVOS DE *Ascaris* sp.: a) OVO EMBRIONADO (UMA CÉLULA); b) OVO INVIÁVEL; c) OVO VIÁVEL LARVADO

FONTE: FCFRP-SP (2012)

## 2.5 APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO DE PARASITAS EM LODO DE ESGOTO

Ensaio visando à identificação e à quantificação de parasitas em lodo de esgoto podem receber uma valiosa contribuição utilizando-se ferramentas da biologia molecular. Isto porque as técnicas moleculares apresentam vantagens que incluem maiores acurácia e rapidez de resposta, além da possibilidade de identificação de organismos não cultiváveis, utilizando-se técnicas da metagenômica.

A maior parte das pesquisas existentes em diagnóstico molecular de parasitas é oriunda de estudos clínicos e, portanto, utiliza amostras fecais para detecção e quantificação do material genético dos patógenos. Entretanto, apesar da composição mais complexa e a presença de maior número de interferentes no lodo de esgoto, resultados obtidos a partir de amostras fecais podem ser bons indicativos do potencial destas técnicas para amostras sanitárias. A seguir são apresentadas, com base em literatura recente, as técnicas moleculares para detecção de parasitas que vêm obtendo resultados expressivos e com potencial para o diagnóstico de patógenos em amostras de lodo sanitário.

### 2.5.1 Extração do material genético presente em amostras ambientais

A qualidade da análise molecular de qualquer tipo de amostra, seja ela oriunda de cultivos puros ou diretamente de alguma fonte ambiental, depende do

método utilizado para a extração do material genético presente no meio a ser analisado (MARTIN-LAURENT *et al.*, 2001). Este processo torna-se bastante laborioso no caso de amostras complexas como o lodo de esgoto, que apresentam grande quantidade de compostos interferentes às técnicas moleculares (WILSON, 1997).

Compostos interferentes podem formar complexos com os ácidos nucleicos (DNA e RNA), impedindo sua separação do restante da amostra. Estes interferentes podem, também, inibir a atividade de enzimas como a DNA polimerase, essencial à realização da maior parte dos ensaios moleculares (WILSON, 1997). Dessa forma, é fundamental a extração e purificação adequada do material genético presente na amostra para que não ocorram erros de diagnóstico devido ao mascaramento do DNA/ RNA alvo. Entre os principais interferentes descritos para lodo de esgoto encontram-se os ácidos húmicos e fúlvicos, alguns compostos fenólicos e metais pesados (TSAI e OLSON, 1992; STINEAR *et al.*, 1996; WILSON, 1997; BRAID *et al.*, 2003; SCHRIEWER *et al.*, 2011).

A presença de compostos inibidores leva a resultados falso-negativos, por inibirem a atividade da DNA polimerase, necessária para a amplificação do segmento gênico alvo (STINEAR *et al.*, 1996; LOGE *et al.*, 2002; AUDEMARD *et al.*, 2004). Entretanto, metodologias de preparo de DNA que visam minimizar a interferência dos inibidores têm sido desenvolvidas e têm apresentado bons resultados. Pode-se citar o uso de sondas de oligonucleotídeos acopladas a esferas paramagnéticas capazes de encontrar e hibridizar apenas com o DNA em amostras complexas (STINEAR *et al.*, 1996; KAUENER e STIENER, 1998); aplicação de resinas para adsorção de ácidos húmicos durante a extração do material genético (SCHRIEWER *et al.*, 2011); cromatografia de troca iônica ou por exclusão (HURT *et al.*, 2001), e eletroforese para separação do DNA, com posterior excisão do fragmento de gel contendo o material genético (ZHOU *et al.*, 1995).

Metodologias menos sofisticadas também têm sido efetivas na remoção de inibidores da PCR. Como exemplo pode ser citada a realização de diluições sucessivas da amostra para extração, em casos em que haja grande quantidade do material genético de interesse (QUEIPO-ORTUNO *et al.*, 2008), uso de floculantes (BRAID *et al.*, 2003) e adição de albumina do soro bovino nas

amostras durante a extração (WANG *et al.*, 2007). Nesses casos, a possibilidade de associar o aumento da eficiência da reação com custos reduzidos torna estes métodos bastante atraentes.

Outro fator importante na extração do material genético é associar à remoção dos interferentes das amostras um procedimento adequado de purificação dos ácidos nucleicos. Isto porque é fundamental que o material genético possa ser recuperado mantendo sua integridade assim como em concentração suficiente para realização das análises posteriores (ROH *et al.*, 2006).

A purificação é um ponto crítico durante a extração do RNA de amostras ambientais (BORNEMANN e TRIPLET, 1997; YU e MOHN, 1999; ALM e STAHL, 2000). Por tratar-se de uma molécula instável e altamente susceptível à ação de nucleases presentes no interior das células e também dispersas em qualquer meio biológico, o RNA pode ser rapidamente degradado ou danificado caso os procedimentos de purificação não sejam adequados (HURT *et al.*, 2001).

O uso de *kits* comerciais para extração simultânea de DNA e RNA de lodo garante alta purificação e recuperação dos ácidos nucleicos (ROH *et al.*, 2006). A principal vantagem refere-se à rapidez de extração do material genético das amostras associada à elevada pureza do material obtido. A extração por um método de elevada recuperação como este é adequada para a obtenção de quantidades padronizadas de DNA ou RNA a serem utilizadas em curvas de calibração para quantificação absoluta por PCR em tempo real, por exemplo. Entretanto, seu custo deve ser considerado na realização de ensaios de diagnóstico molecular contendo grande número de amostras (ROH *et al.*, 2006).

### **2.5.2 PCR convencional**

A Reação em Cadeia da Polimerase, ou PCR, é uma técnica que revolucionou o campo da biologia molecular desde o seu desenvolvimento por Kary Mullis (SAIKI *et al.*, 1985).

O princípio da PCR é simples: trata-se do aumento do número de cópias de determinado segmento de DNA de interesse presente na amostra, até que se atinja uma quantidade que possa ser visualizada em gel, após corrida eletroforética. O uso de sequências de oligonucleotídeos iniciadores, ou *primers*,

capazes de se anelar apenas na sequência de interesse, garante a especificidade da técnica. Ciclos de temperatura pré-definidos levam a repetidas etapas de desnaturação do DNA alvo, anelamento dos iniciadores nas regiões específicas e amplificação da sequência desejada por uma enzima polimerase termoestável. Desta forma, é relativamente simples detectar a presença de um determinado patógeno na amostra, desde que se defina previamente qual sequência alvo do DNA deste organismo deseja-se amplificar e, a partir daí, desenhar os iniciadores adequados para o reconhecimento desta sequência (LEWIN, 2007).

O uso da PCR convencional, ou “end-point” PCR, tornou-se corriqueiro em laboratórios de diversas áreas, e a engenharia sanitária não é exceção. Para diagnóstico de parasitas, entretanto, essa técnica apresenta uma grande limitação, pois é capaz de indicar presença ou ausência de determinada espécie, porém não de quantificá-la facilmente e com precisão. De qualquer forma, sua contribuição tem sido notável, seja na caracterização de diferentes populações microbianas em amostras de lodo (CHOI *et al.*, 2007; MCMAHON *et al.*, 2007; PINHATI, 2008; WANG e ZHAO, 2011), detecção de material genético de enterovírus, adenovírus, vírus da hepatite A e rotavírus em amostras ambientais (SHIEH *et al.*, 1997; BARRELLA, 2008; RIGOTTO *et al.*, 2010); determinação da presença de alguns parasitas como, por exemplo, os gêneros de protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* em lodo doméstico (RIMHANEN-FINNE *et al.*, 2001; COUPE *et al.*, 2005; KHOUJA *et al.*, 2010); ou diagnóstico de *Ascaris* sp. em amostras de tecido do hospedeiro (ISHIWATA *et al.*, 2004).

Um variação interessante do método da PCR é a *Nested-PCR* em que, após a primeira amplificação do DNA, é realizada uma nova reação de PCR utilizando-se iniciadores adicionais. Esta técnica minimiza a amplificação inespecífica, isto é, de segmentos que não sejam aquele definido como alvo. Desta forma, a *Nested-PCR* apresenta alta eficiência de detecção do DNA de interesse em amostras ambientais, onde é comum a presença de compostos que atuam como interferentes ao método (TOZE, 1999; FORMIGA-CRUZ *et al.*, 2005).

Por se tratar de uma técnica que define apenas a presença/ausência de organismos, pesquisas que utilizam a PCR convencional para diagnóstico de helmintos em lodo de esgoto são poucas (PECSON, 2006). Outro fator limitante é a impossibilidade de distinguir organismos viáveis daqueles inviáveis, pois o DNA pode manter-se estável, livre no meio ou no interior de células mortas, por um

longo período de tempo (MCKILLIP *et al.*, 1998; YARON e MATTHEWS, 2002; FONTAINE e GUILLOT, 2003).

### 2.5.3 PCR em tempo real

A PCR em tempo real, também denominada PCR quantitativa ou qPCR, surgiu como resposta à necessidade de quantificar o material genético amplificado durante os ciclos de reação da polimerase (PORCHER *et al.*, 1992; HIGUSHI *et al.*, 1993; GIBSON *et al.*, 1996; HEID *et al.*, 1996). Desde então foi estabelecida como uma técnica robusta amplamente utilizada em investigações biológicas variadas, dada a sua capacidade para detectar e quantificar baixas concentrações de ácidos nucleicos (VALASEK e HEPA, 2005; VANGUILDER *et al.*, 2008).

Enquanto a PCR convencional exige a realização de eletroforese em gel para detectar o produto amplificado, a tecnologia da qPCR quantifica os produtos em tempo real e durante cada ciclo da reação. Neste caso os ensaios são conduzidos em um termociclador (conhecido como Sistema de Detecção de Sequências, ou SDS) que monitora a emissão crescente de fluorescência à medida que mais cópias do gene são geradas (BUSTIN, 2004).

Na técnica em tempo real há duas espécies de compostos fluorescentes que podem ser utilizados para quantificar o produto da PCR em um equipamento SDS: SYBR Green® e TaqMan® ambas tecnologias desenvolvidas e patenteadas pela empresa Applied Biosystems. A principal diferença entre elas está relacionada ao alvo de ligação: SYBR Green se ligará a todo DNA dupla fita encontrado na amostra, enquanto TaqMan reconhecerá apenas a sequência alvo do DNA a ser amplificado, aumentando a especificidade da técnica (APPLIED BIOSYSTEMS, 2007).

O princípio da técnica TaqMan® envolve a utilização de uma sonda (sequência oligonucleotídica) específica para o DNA alvo, marcada com um fluoróforo repórter na posição 5'. Esta mesma sonda, na posição 3', apresenta uma molécula inibidora de fluorescência, denominada de *quencher*. Enquanto estão próximos, isto é, ambos ligados à sonda, o *quencher* é capaz de inibir a fluorescência emitida pelo fluoróforo. Entretanto, ao encontrar e ligar-se à sequência alvo, a sonda é clivada pela ação da enzima DNA polimerase, e o fluoróforo é liberado. Uma vez afastado de seu inibidor, o fluoróforo pode emitir

fluorescência que é capturada e quantificada pelo equipamento SDS (APPLIED BIOSYSTEMS, 2007). Na Figura 2.8 é apresentado um desenho esquemático da produção de fluorescência utilizando-se sondas TaqMan<sup>®</sup>.

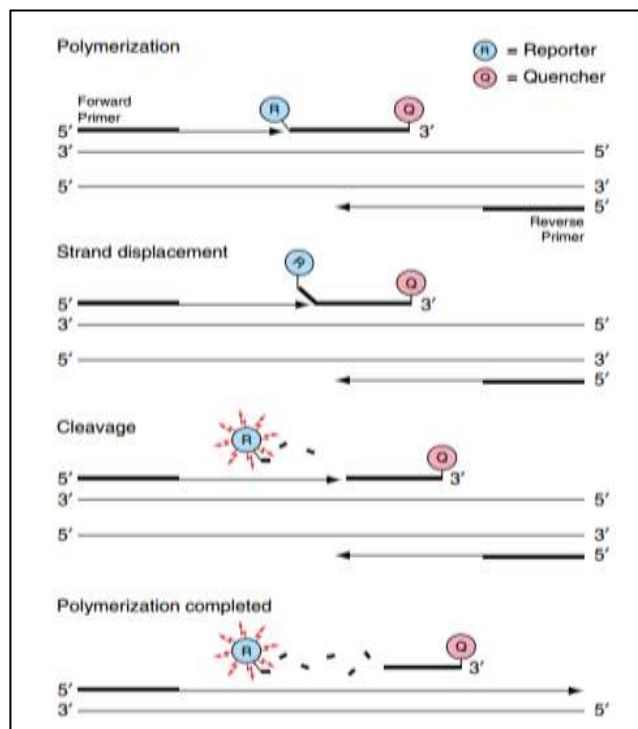


FIGURA 2.8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA UTILIZANDO-SE SONDA TaqMan<sup>®</sup>.

Nota: O fluoróforo repórter é liberado e emite fluorescência após o início da polimerização pela DNA polimerase e consequente clivagem da sonda

FONTE: Applied Biosystems (2010)

Durante os ensaios de qPCR, a quantidade de fluorescência de cada amostra é monitorada, resultando em uma curva que relaciona a quantidade de DNA amplificado com o valor de Ct, ou *threshold cycle*, que é o número do ciclo da PCR em que a fluorescência ultrapassa a linha base. Atualmente, padronizou-se o uso do termo Cq (ciclo de quantificação), em substituição ao Ct, mas com significado similar (BUSTIN *et al.*, 2009). Na Figura 2.9 é apresentado, como exemplo, um gráfico de amplificação obtido em um ensaio de PCR Tempo Real (APPLIED BIOSYSTEMS, 2007). Este gráfico relaciona a emissão da fluorescência normalizada durante a amplificação, denominada de  $\Delta R_n$  com o respectivo valor de Cq. A normalização da fluorescência visa minimizar as diferenças devido às variações no comprimento do caminho óptico da luz incidente

sobre cada amostra. Como as amostras encontram-se em posições diferentes durante o ensaio, em geral em uma placa de reação, as variações do caminho óptico da luz de excitação podem interferir na real fluorescência emitida por cada amostra. Assim, a fluorescência emitida é normalizada dividindo-se o valor obtido em cada amostra por um. No caso de uma curva de calibração, os valores de C<sub>q</sub> são relacionados com as concentrações de DNA padrão. Na Figura 2.10 é apresentado um exemplo de uma curva de calibração obtida por PCR em Tempo Real (APPLIED BIOSYSTEMS, 2007).



FIGURA 2.9 - NÚMERO DE CICLOS VS FLUORESCÊNCIA ( $\Delta R_n$ ) OBTIDO EM ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL

Notas:  $\Delta R_n$  – intensidade de fluorescência normalizada; linha azul horizontal indica o threshold ou limite

FONTE: Applied Biosystems (2007)

Ensaio de detecção mais sensíveis e a maior reprodutibilidade obtida nas pesquisas realizadas em qPCR permitiram criar novas soluções para antigos problemas, difundindo a técnica para todas as áreas que apresentassem algum enfoque biológico (VANGUILDER *et al.*, 2008). Em pouco tempo a PCR em tempo real tornou-se uma ferramenta indispensável em ensaios de DNA, incluindo-se aí o diagnóstico molecular de parasitas em amostras ambientais.



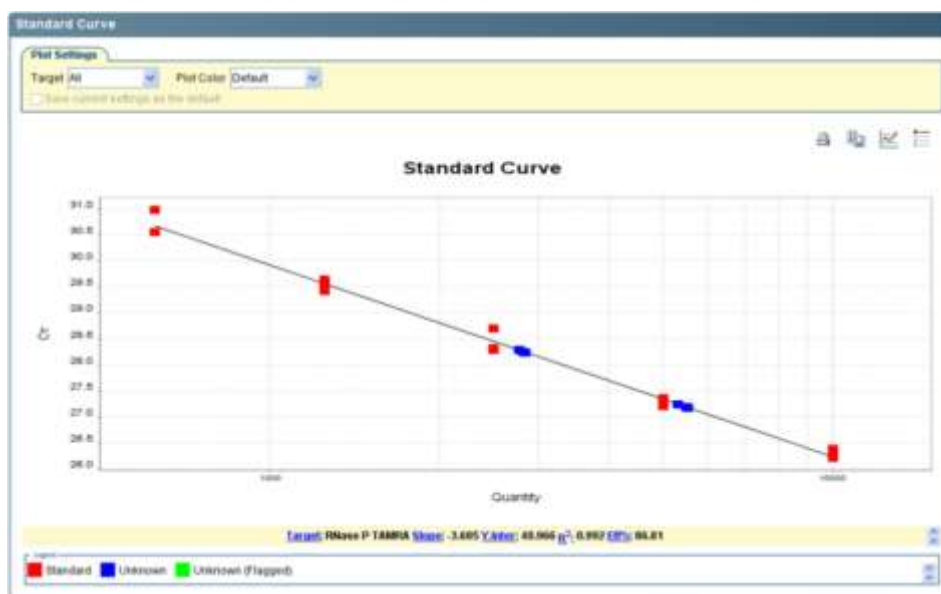


FIGURA 2.10 – CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA EM ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL. A QUANTIDADE DE UMA AMOSTRA DESCONHECIDA É DETERMINADA COM BASE NO SEU VALOR DE  $C_q$

FONTE: Applied Biosystems (2007)

A técnica convencional da PCR, já utilizada em ensaios de diagnóstico, ganhou reforço com o advento da qPCR, permitindo não só a determinação da presença ou ausência de patógenos, mas também a quantificação destes organismos nas amostras. Dessa forma, amostras de lodo tornaram-se adequadas para a aplicação desta técnica, devido à necessidade de se quantificar o material biológico presente nesse tipo de resíduo. Exemplos de organismos mensurados em lodo de esgoto a partir de análises de qPCR incluem enterovírus (SANO *et al.*, 2003; MONPOENHO *et al.*, 2004); reovírus (GALLAGHER e MARGOLIN, 2006), protozoários (ALONSO *et al.*, 2011); enterococos (VIAU e PECCIA, 2009) e *Escherichia coli* (WÉRY *et al.*, 2008). Pecson e colaboradores (2007) desenvolveram uma técnica de quantificação de ovos de *Ascaris* através de qPCR de uma região do DNA ribossomal (ITS-1) do parasita e 75% das amostras não apresentaram diferença estatística do método padrão de contagem microscópica (PECSON *et al.*, 2007).

Apesar da grande diversidade biológica existente em amostras de lodo de esgoto e biossólidos em geral, muitas vezes o organismo de interesse encontra-se em pequeno número, dificultando a detecção por métodos convencionais. A alta sensibilidade da qPCR, entretanto, confere a ela capacidade de indicar a presença

de determinado organismo, ainda que este se encontre em quantidades bastante reduzidas. Kramme e colaboradores (2011), utilizando a qPCR para diagnóstico de *Strongyloides* spp. em amostras fecais obtiveram o limite de detecção (com 95% de confiança) de apenas uma larva por ensaio de PCR. Isto é, aplicando-se o teste de diagnóstico, havia 95% de probabilidade de o resultado ser positivo, mesmo contendo somente o DNA de uma única larva de estrogilóide na amostra.

O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico de parasitas por qPCR multiplex também vem apresentando resultados promissores. Uma técnica multiplex envolve a detecção simultânea de vários DNA alvos, ou seja, várias espécies patogênicas diferentes. Qvarnstrom e colaboradores (2006) definiram uma metodologia qPCR multiplex para detecção de três espécies diferentes de amebas de vida livre causadoras de quadros patogênicos severos no homem e o método mostrou-se sensível para detecção de apenas uma ameba por ensaio em amostras clínicas. Basuni e colaboradores (2011) desenvolveram uma técnica pentaplex para detecção de quatro espécies diferentes de geohelminhos em amostras fecais (*Ancylostoma*, *Necator americanus*, *Ascaris lumbricoides* e *Strongyloides stercoralis*) e os resultados indicaram alta sensibilidade e especificidade do método quando comparado à técnica por contagem microscópica.

Apesar de ser uma técnica bastante sensível e capaz de quantificar o material genético com elevada eficiência, ainda são poucos os estudos que associam a PCR quantitativa com a detecção de helmintos parasitas em lodo sanitário. Isto porque mesmo sendo capaz de quantificar, a aplicação isolada da qPCR não permite distinguir entre organismos viáveis e não-viáveis presentes nas amostras de lodo.

#### **2.5.4 RT-PCR**

A técnica da transcrição reversa combinada com a reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) provou ser uma metodologia adequada para quantificar expressão gênica (LIVAK, 2001).

Trata-se de uma técnica bastante sensível, utilizada para detectar os níveis de expressão de RNA em uma amostra. Os ensaios são realizados em duas etapas. Primeiramente o RNA de interesse é convertido em DNA complementar

(cDNA) por uma enzima transcriptase reversa. Este cDNA é então utilizado como alvo (ou molde) em uma reação de amplificação com iniciadores específicos por PCR convencional (PCR) ou em tempo real (qPCR) (LEWIN, 2002).

A principal vantagem do uso desta técnica em ensaios para detecção de patógenos é a capacidade de quantificar por qPCR apenas material de organismos vivos, pois o RNA apresenta tempo de meia-vida curto nas células, geralmente de algumas horas, dependendo do produto a ser expresso (LEWIN, 2002). Alguns estudos que já utilizaram esta técnica em amostras sanitárias incluem: detecção de vírus da hepatite A, poliovírus e rotavírus em esgoto (TSAI *et al.*, 1994), vírus entéricos e *Salmonella* em lodo anaeróbio (WONG *et al.*, 2010), detecção da viabilidade de patógenos não cultiváveis presentes em biossólidos (DUNAEV *et al.*, 2008) e bactérias patogênicas como *Listeria* sp., *Staphylococcus* spp. e *Yersinia enterocolitica* em lodos aeróbio e anaeróbio (BURTSCHER e WUERTZ, 2003).

## 2.6 RT-PCR DE *Ascaris* EM FASE EMBRIOGÊNICA

Uma metodologia adequada para detecção molecular de ovos de *Ascaris* sp. em lodo de esgotos deve, além de quantificar apenas o DNA de organismos vivos, diferenciar o material genético de adultos e formas embrionárias. Como cuidado adicional deve-se evitar o uso, como alvo, de uma região de DNA muito polimórfica, isto é, que apresente grandes variações na sequência de interesse, seja em uma mesma espécie ou entre espécies muito próximas (LEWIN, 2002).

A região ITS1 (do inglês *Internal Transcribed Spacer 1*) do DNA nuclear de *Ascaris* é uma região que codifica para RNA não funcional e está localizada entre os genes do RNA ribossomal. Várias pesquisas têm sido realizadas com o parasita *Ascaris* utilizando esta região como alvo molecular (JOHNSON *et al.*, 1998; ISHIWATA *et al.*, 2004; PECSON *et al.*, 2006), entretanto seu uso é mais coerente com pesquisas epidemiológicas, pois esta região do DNA varia bastante, mesmo dentro de uma mesma espécie de *Ascaris* (ANDERSON, 2001).

Zhu e colaboradores (1999) utilizando PCR-RFLP (do termo em inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição) encontraram diferenças no perfil de restrição entre *A. suum* e *A. lumbricoides* em regiões ITS1. Peng e colaboradores (2003), também

utilizando o mesmo alvo molecular, encontraram cinco genótipos diferentes de *Ascaris* spp. De acordo com Arizono e colaboradores (2010) a sequência de ITS-1 apresenta dois sítios altamente polimórficos (posições 133 e 246) entre as espécies de *Ascaris* de origem humana e suína. Entretanto, apesar dessa região ser mais susceptível a mutações e, dessa forma, apresentar maior variabilidade entre espécies próximas, sequências conservadas também podem ser encontradas na região ITS1 e seu uso como alvo em reações de quantificação não pode ser descartado, principalmente devido ao elevado número de cópias desta região no genoma (PECSON *et al.*, 2006).

Genes constitutivos, ou *housekeeping genes*, são alvos moleculares adequados para realização de ensaios de RT-qPCR, pois apresentam expressão proteica constante em todas as células do organismo e, portanto, grande quantidade de material genético de interesse para ser analisado (LIVAK, 2001). Entretanto, para a quantificação de ovos viáveis de helmintos, a escolha do gene também deve levar em consideração a etapa de desenvolvimento do parasita que se deseja detectar, nesse caso, a embriogênese.

Conforme apresentado na Seção 2.3.2, a proteína ALEP1 de *Ascaris* está associada a um gene estrutural cuja expressão encontra-se associada à fase embriogênica, devido ao mecanismo de redução da cromatina descrito para este grupo. Dessa forma, o RNA mensageiro que codifica para ALEP1 associa três características necessárias para o reconhecimento de ovos viáveis do parasita na amostra:

- 1) na forma de transcrito (mRNA) está relacionado apenas às células viáveis;
- 2) está associado a um gene estrutural (proteína ribossomal) e, portanto, deve apresentar expressão constante em todas as células e em quantidade adequada para ser mensurado;
- 3) a proteína ALEP1 é expressa em maior quantidade durante a fase embriogênica do parasita, devido ao mecanismo de redução da cromatina observada nesta espécie.

Assim, o uso do mRNA de ALEP1 em ensaios de RT-qPCR pode ser útil para indicar a viabilidade de ovos de *Ascaris* em amostras de lodo de esgoto, com menor risco de obtenção de resultados falso-positivos, ocasionados devido à maior estabilidade do DNA no meio. A sequência de cDNA do RNA mensageiro de

ALEP1 é apresentada na Figura 2.11 (ETTER *et al.*, 1991).

Conforme apresentado anteriormente, sequências de DNA ou RNA utilizadas como alvos em ensaios moleculares para detecção de ovos de *Ascaris* devem apresentar sensibilidade suficiente para reconhecer ambas as espécies do gênero, *A. suum* e *A. lumbricoides*. Uma ferramenta bastante útil para comparar sequências de ácidos nucleicos ou de proteínas e indicar similaridade entre diferentes organismos é o algoritmo BLAST® (ALTSCHUL *et al.*, 1990), disponível no sítio do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). Utilizando a sequência do cDNA de ALEP1 de *Ascaris lumbricoides* da Figura 2.11 em uma análise no BLASTn® (alinhamento de nucleotídeos) o resultado obtido foi de 100% de similaridade com uma sequência de *Ascaris suum* que codifica igualmente para uma proteína ribossomal S19 (Figura 2.12). A correspondência total entre as sequências das espécies confirma o cDNA de ALEP1 como alvo molecular capaz de identificar ambas as espécies de *Ascaris* em ensaios para determinação de ovos viáveis do parasita em amostras de lodo de esgoto doméstico.

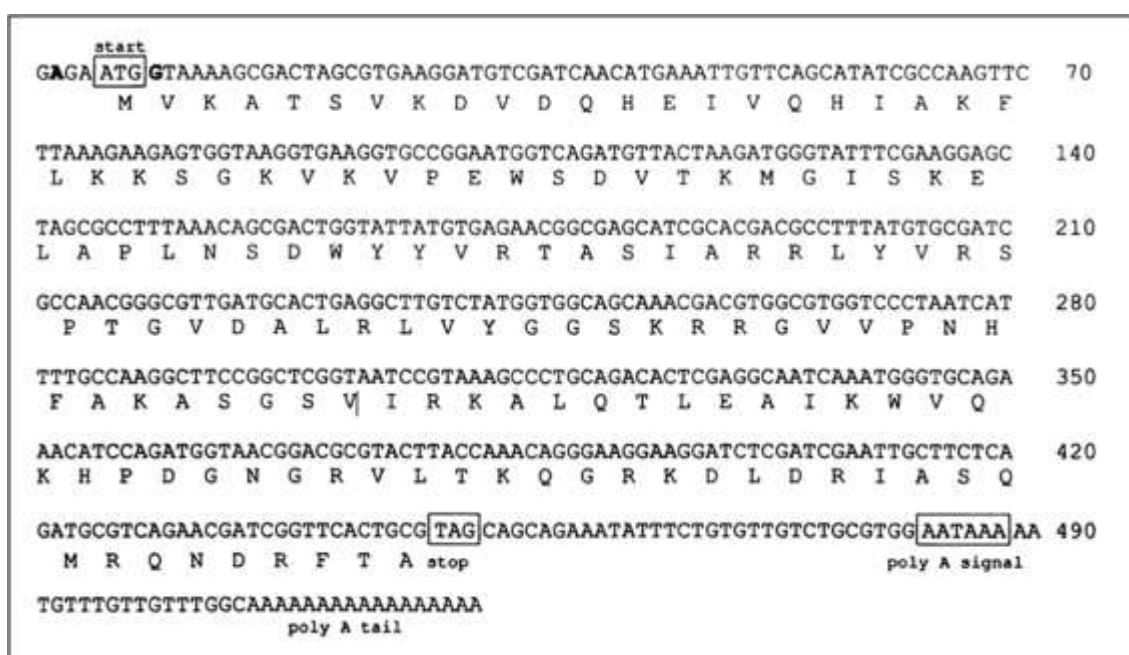


FIGURA 2.11 – SEQUÊNCIA DO DNA COMPLEMENTAR DO mRNA DE alep1 DE *Ascaris lumbricoides*. NOS RETÂNGULOS: CÓDON DE INÍCIO (ATG), CÓDON DE TERMINAÇÃO (TAG) E SINAL DA CAUDA POLI- A

FONTE: Etter *et al.* (1991)

## 2.7 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS: A BUSCA PELO 'GOLD STANDARD'

Desde 1992 quando, pela primeira vez, uma norma reguladora impôs limites à concentração de patógenos em biossólidos de aplicação agrícola (USEPA, 1992), várias tentativas para desenvolver e padronizar um método para a determinação de ovos viáveis de helmintos têm sido levadas a efeito (GASPARD *et al.*, 1996; HUYARD *et al.* 2000; BEAN e BRABANTS, 2001; GASPARD e SCHWARTZBROD, 2003; PECSON *et al.*, 2007).

Para que um método quantitativo seja considerado adequado ele deve apresentar elevada acurácia, isto é, deve ser capaz de recuperar a maior quantidade de ovos inoculados em uma amostra, assim como garantir a reprodutibilidade dos ensaios (BOWMAN *et al.*, 2003). Além disso, é fundamental que o método seja capaz de detectar e enumerar diferentes patógenos nos biossólidos com um grau conhecido de confiança (SIDHU e TOZE, 2009). Características adicionais incluem alta sensibilidade, rapidez e facilidade de realização.

Os primeiros protocolos testados apresentavam baixa acurácia, principalmente devido à ausência de informações sobre como os compostos químicos utilizados poderiam interferir na integridade e viabilidade dos ovos dos parasitas (SATCHELL *et al.*, 1986). Entretanto, nas últimas décadas, vários estudos foram realizados acerca das condições ideais de processamento e incubação das amostras que assegurem a viabilidade dos ovos recuperados (GASPARD *et al.*, 1996; JOHNSON *et al.*, 1998; NELSON e DARBY, 2001; CRUZ *et al.*, 2012).

Um dos primeiros métodos a atingir níveis adequados de acurácia e precisão foi o método de Tulane, desenvolvido por Reimers e colaboradores em 1981. As pesquisas tinham como objetivo avaliar a presença e a densidade de formas resistentes de parasitas, em amostras de lodo de esgoto, de diferentes estações de tratamento da região sul dos Estados Unidos. O método desenvolvido para recuperação de ovos de helmintos incluía uma etapa de lavagem com detergente aniônico (Linbro<sup>®</sup> 7X), floculação com solução de MgSO<sub>4</sub> (SG 1,2) e incubação em solução de formalina 0,5% (REIMERS *et al.*, 1989).

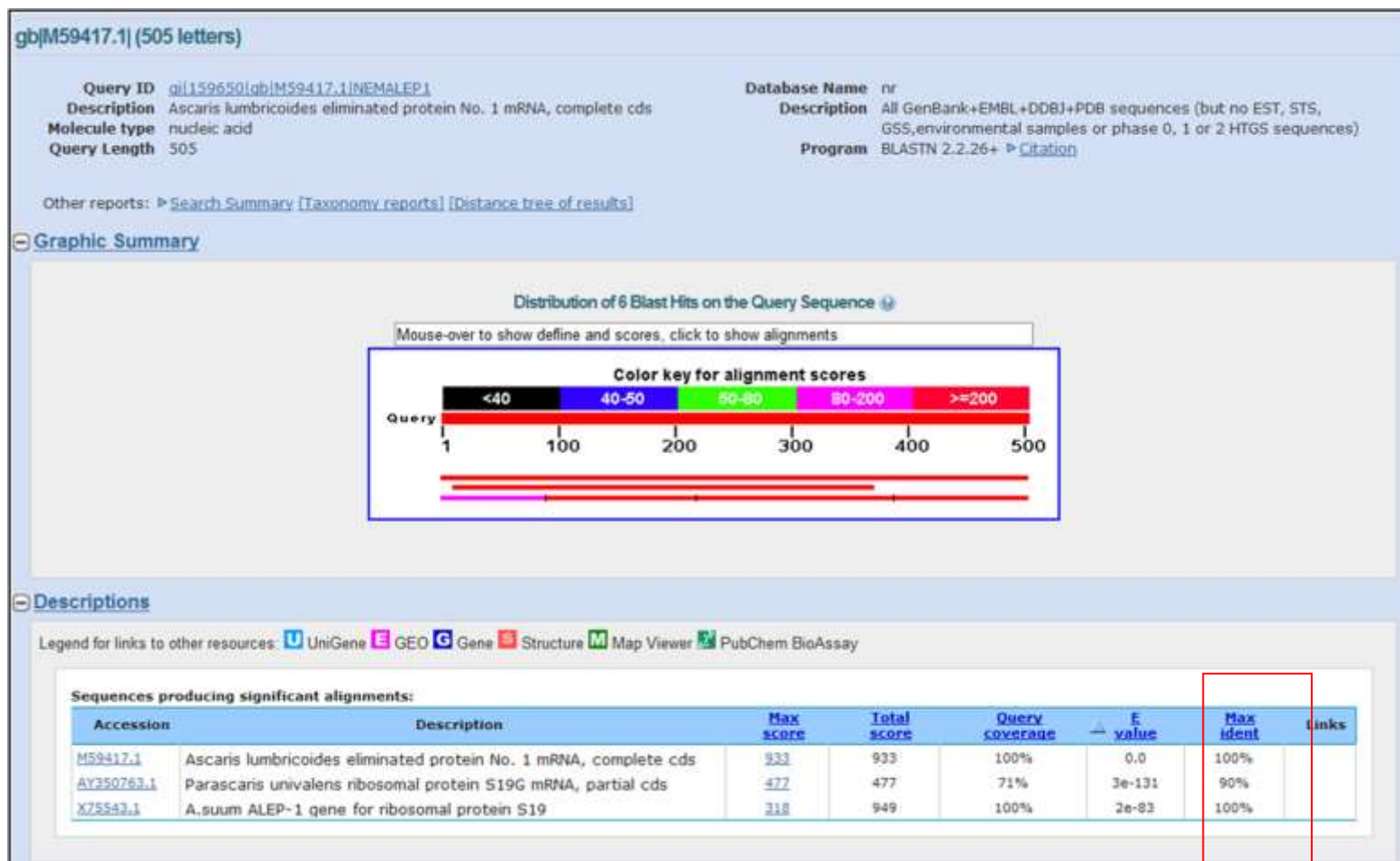


FIGURA 2.12 – ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DO cDNA DE alep1 DE *Ascaris lumbricoides* PELO ALGORITMO BLAST®

FONTE: O autor (2012)

Nota: Dentro do retângulo vermelho encontram-se as porcentagens de similaridade com outras sequências do banco genômico

Em 1987, Yanko definiu uma nova metodologia de determinação de ovos, baseada no método de Tulane. Nessa nova estratégia, água morna de torneira foi utilizada na dessorção dos ovos do lodo. Para a floculação foi utilizada solução de  $ZnSO_4$  (SG 1,2) e os ovos, após a etapa de concentração, foram incubados em solução  $H_2SO_4$  0,1 N. O limite de detecção deste método foi de 0,2 ovos de *Ascaris* por grama de sólido (YANKO, 1987). A acurácia do método também foi satisfatória, recuperando, em média 88% dos ovos das amostras inoculadas. Em 1992, a USEPA definiu o método de Yanko como a metodologia padrão para quantificação de ovos viáveis de helmintos em amostras de lodo e águas residuárias (USEPA, 1992).

Novos estudos, entretanto, continuaram a ser realizados visando encontrar um método ainda mais eficaz e com elevada taxa de recuperação dos ovos nas amostras. Gaspard e colaboradores (1996) desenvolveram um protocolo de recuperação e determinação da viabilidade dos ovos de helmintos, utilizando uma etapa de lavagem bifásica com SDS 0,01% e acetato de etila, seguida de duas etapas de floculação com NaCl (SG 1,19). Após o processamento, as amostras eram incubadas em água deionizada em temperatura de 30°C. O aumento da temperatura resultou no desenvolvimento mais rápido das fases larvais nas amostras incubadas, tendo sido atingida a fase L1 (*Ascaris*) em 13 dias. Os pesquisadores avaliaram ainda uma etapa de extração após a fase de incubação, utilizando ultrassonicação e hipoclorito de sódio. As amostras submetidas a este procedimento apresentaram recuperação, em média, 40% maior do que aquelas sem o tratamento (GASPARD *et al.*, 1996), tendo sido obtido 80% de acurácia.

Várias outras metodologias de determinação da viabilidade de ovos de helmintos são descritas na literatura (HUYARD *et al.*, 2000; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2000; BEAN e BRABANT, 2001), entretanto, não existem dados de Garantia de Qualidade-Control de Qualidade (QA/QC) para esses métodos, seja porque o número de repetições realizados em ensaios de recuperação foram insuficientes, a amostragem não foi representativa ou, ainda, não foram fornecidas informações sobre a qualidade dos dados analíticos obtidos (BOWMAN *et al.*, 2003).

Em 2003, Bowman e colaboradores revalidaram a acurácia e precisão do método de Tulane. Em seus ensaios, o método apresentou recuperação dos ovos variando de 75,5% para lodo anaeróbico em lagoa, 80% para amostras de lodo acidificado e 58% para lodo caledado (BOWMAN *et al.*, 2003). No mesmo ano a



USEPA estabeleceu, com base no método de Tulane, a nova metodologia padrão para quantificação de ovos viáveis de *Ascaris* em amostras de lodo de esgoto. Em relação ao método original, as principais alterações incluem a substituição da etapa de extração por filtração em peneira de 400 mesh e a incubação dos ovos recuperados em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N (USEPA, 2003). Em 2006, a Resolução brasileira CONAMA 375/ 06 adotou o método da USEPA (2003) como metodologia padrão para quantificação de ovos viáveis de helmintos em amostras de lodo.

De Victorica e Galván (2003) desenvolveram uma metodologia de quantificação que dispensa a etapa de incubação dos ovos recuperados. Nos protocolos desenvolvidos pelos autores, a etapa de extração é substituída por filtragem em membranas com poros de 0,8 µm de diâmetro. Após a filtração, os ovos são removidos da membrana e corados com soluções indicativas de viabilidade, como por exemplo, safranina e azul de metileno. O método baseia-se no fato de que ovos inviáveis apresentam alterações na estrutura da membrana celular que os tornam permeáveis a alguns tipos de corantes (ZHOU *et al.* 1985). A principal vantagem do método é a rapidez com que os ensaios podem ser realizados, pois não é necessário esperar pelo desenvolvimento da larva do parasita. Utilizando esse método os autores conseguiram até 77% de acurácia, o que é bastante razoável, considerando que o tempo de ensaio é de apenas 6 horas (DE VICTORICA e GALVÁN, 2003).

Na Tabela 2.1 são apresentados alguns dos principais métodos de determinação de ovos viáveis de helmintos descritos na literatura. As principais diferenças estão relacionadas às soluções utilizadas nas etapas de dessorção, floculação, extração e incubação. Alguns métodos, como de Tulane (1989) e Gaspard *et al.* (1996) realizam a etapa de extração após a incubação dos ovos, com o objetivo de induzir a eclosão dos ovos larvados.

## 2.8 GARANTIA DE QUALIDADE-CONTROLE DE QUALIDADE (QA-QC)

Nas últimas décadas, vários ensaios de viabilidade de ovos de parasitas em bio-sólidos foram desenvolvidos. Entretanto, nenhum método foi universalmente aceito, principalmente devido à falta de dados publicados de Garantia de Qualidade e Controle de Qualidade (QA-QC) para os protocolos desenvolvidos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2002; BOWMAN *et al.*, 2003).

Os termos garantia de qualidade e controle de qualidade, são muitas vezes utilizados como sinônimos para se referir a formas de garantir a qualidade de um serviço ou produto. Os termos, no entanto, têm significados diferentes. Garantia de qualidade refere-se ao planejamento e implementação de atividades que garantam que os requisitos de qualidade de um produto ou serviço sejam cumpridos. O controle de qualidade, por sua vez, é formado por técnicas de observação e atividades capazes de detectar e corrigir eventuais falhas no processo, visando atingir a qualidade exigida (KONIECZKA e NAMIÉSNIK, 2009).

Em relação às técnicas de determinação de patógenos em amostras de lodo, a garantia de qualidade envolve: (i) estabelecer um plano de amostragem representativo, ou seja, que contemple toda a variabilidade esperada no lodo de esgoto, inclusive devido a mudanças operacionais ou climáticas; (ii) descrever como a qualidade dos dados analíticos foi garantida durante a aplicação de determinado protocolo e (iii) realizar as análises em um laboratório independente que possa garantir a idoneidade dos ensaios (USEPA, 2003).

O controle de qualidade assegura que as demandas da garantia de qualidade sejam cumpridas. De acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998), pelo menos sete elementos essenciais compõem o QC: certificação de competência do analista; recuperação de organismos inoculados nas amostras; análise de controles positivos; análise de controles negativos; calibração do método com amostras padronizadas; análises em replicatas e manutenção de gráficos e dados de controle. Para a maior parte dos métodos desenvolvidos, atingir todas as exigências pode ser difícil, entretanto, esses elementos devem ser vistos como os objetivos a serem alcançados na elaboração e implementação de uma metodologia de alta qualidade (USEPA, 2003). Assim, métodos para determinação da viabilidade e quantificação dos ovos de helmintos em amostras de lodo devem seguir um programa QA/QC que ateste a qualidade dos dados obtidos e valide sua aplicação mesmo em diferentes condições de amostragem.

TABELA 2.1 –CARACTERÍSTICAS DE CINCO PRINCIPAIS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE OVOS DE HELMINTOS EM AMOSTRAS DE LODO

Métodos	Características					
	Surfactante	Flotação	Extração	Incubação	Acurácia (%)	Referências
Tulane	Limbro® 7X	MgSO <sub>4</sub>	10% NaClO <sup>a</sup>	Formalina 0,5%	75,5 <sup>b</sup>	Reimers <i>et al.</i> , 1989; Bowman <i>et al.</i> , 2003
Yanko	Água morna	ZnSO <sub>4</sub>	Álcool ácido	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1N	83-92	Yanko, 1987
Gaspard <i>et al.</i>	0,01% SDS	NaCl	Ultrasonicação + NaClO <sup>a</sup>	Água deionizada	87-91	Gaspard, 1996
USEPA	Limbro® 7X	MgSO <sub>4</sub>	Peneiração	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1N	75-80	USEPA, 2003
de Victorica and Galván	NaCl 0,85%	ZnSO <sub>4</sub> / MgSO <sub>4</sub>	Filtração em membranas	Sem incubação	54 -77	de Victorica e Galván, 2003

FONTE: O autor (2013)

Nota: <sup>a</sup> Após a etapa de incubação <sup>b</sup> Para lodo digerido anaerobicamente

## 2.9 DESENVOLVENDO E VALIDANDO NOVOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

O desenvolvimento de novos métodos para ensaios biológicos é fundamental para a melhoria do processo de diagnóstico de patógenos em amostras ambientais. Metodologias que garantam maior acurácia, rapidez e reprodutibilidade aos ensaios, além de possibilitar a minimização de custos, são idealmente almejadas por pesquisadores nas mais diversas áreas. Conforme apresentado na Seção 2.7, a engenharia sanitária não foge a essa regra e busca, constantemente, métodos adequados para a identificação e quantificação de patógenos em amostras sanitárias. Entretanto, é importante salientar que para o desenvolvimento de novos métodos analíticos deve-se seguir, obrigatoriamente, uma sequência de etapas que visem alcançar o objetivo final, isto é, a obtenção de um método inovador, robusto e adequadamente validado (TAVERNIERS *et al.*, 2004).

Cada etapa, ou fase de desenvolvimento da nova metodologia, é importante para o processo global, demandando, muitas vezes, meses ou até mesmo anos, para que seus objetivos específicos sejam alcançados (GREEN, 2010). A validação de metodologias, portanto, é um processo contínuo, que tem início com a descrição do propósito do método, o desenvolvimento dos ensaios e a caracterização do seu desempenho. A continuação ocorre com a documentação da metodologia e a validação dos resultados. É importante ressaltar que o monitoramento contínuo é obrigatório para garantir que os ensaios continuem gerando resultados de acordo com as características de desempenho originalmente definidas (OIE, 2014). Na Figura 2.13 são apresentadas as cinco etapas essenciais para a validação de uma nova metodologia de ensaio biológico.

A Etapa 1 é formada pela seleção do método e pela investigação da viabilidade do ensaio. A escolha do método é um importante aspecto da validação, pois está diretamente relacionada ao propósito e à resposta desejada do experimento. A viabilidade do ensaio, por sua vez, é definida pela seleção dos recursos necessários e pelo formato do ensaio que se pretende desenvolver (TAVERNIERS *et al.*, 2004; EDERVEEN, 2010). Como exemplo, se o interesse do novo método é verificar a perda da viabilidade de partículas virais, um ensaio de infectividade em cultura celular será mais relevante do que ensaios de PCR ou

*Western Blot*, por exemplo (EDERVEEN, 2010).

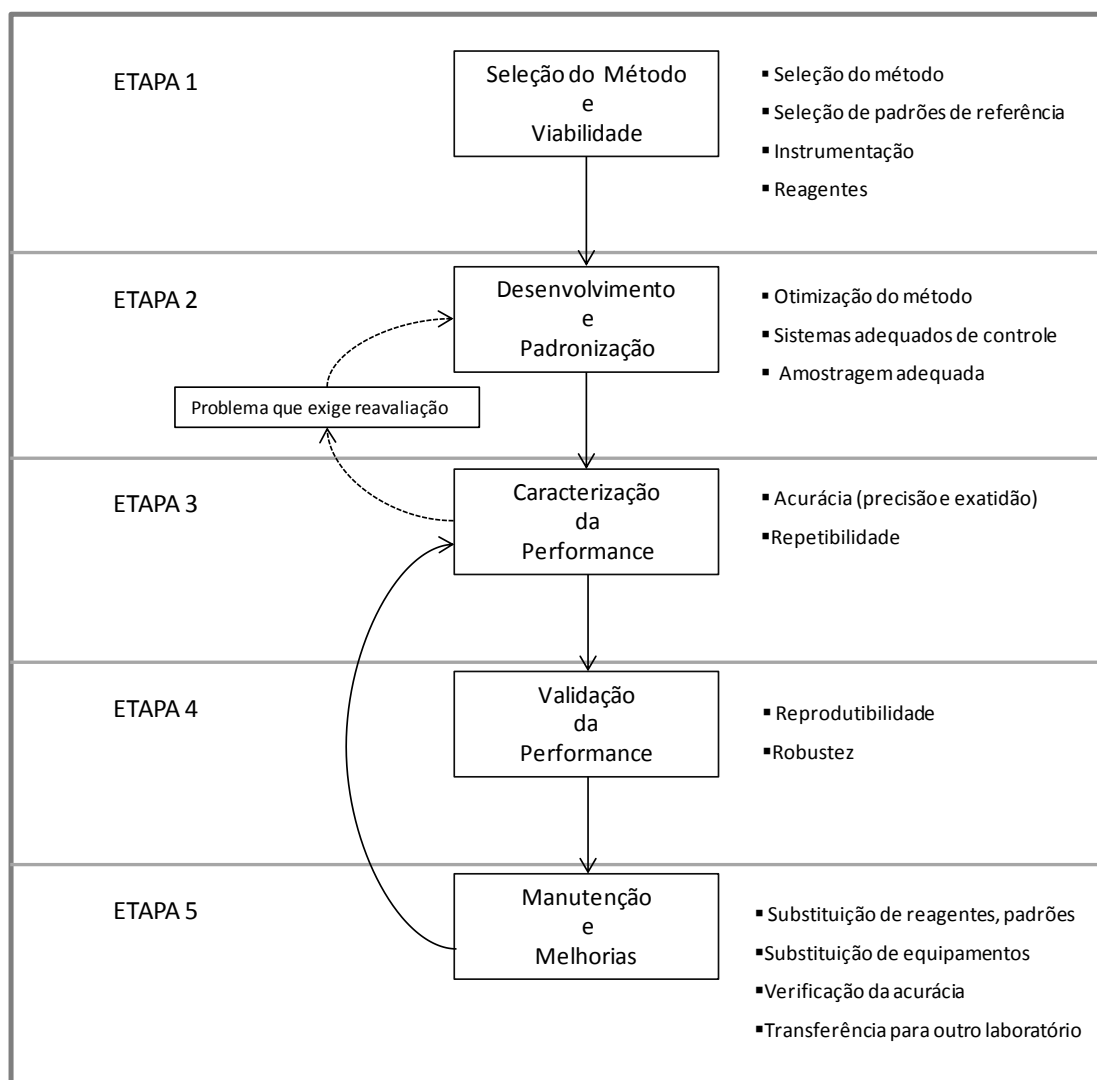


FIGURA 2.13 – ETAPAS NECESSÁRIAS AO PROCESSO DE VALIDAÇÃO DE NOVO ENSAIO BIOLÓGICO

FONTE: Adaptado de Ederveen (2010)

Na sequência, a etapa 2 deverá ser conduzida visando à estruturação do experimento e à obtenção dos parâmetros e condições ótimas para a realização dos ensaios. A determinação da especificidade do ensaio, assim como a verificação da adequação das amostras, condições e equipamentos também deverão ser realizados. Esta etapa é essencial para o sucesso do novo ensaio desenvolvido, pois fornece respostas para perguntas como: “os equipamentos e condições avaliadas são adequados para este método?”, ou ainda: “este método é adequado para determinado tipo de amostra?” (WOOD, 1999; EDERVEEN, 2010). De acordo com a resposta obtida nesta fase, verifica-se se há condições

para a continuidade da validação ou se novas condições deverão ser obtidas.

A etapa 3 consiste na caracterização da performance, utilizando-se amostras e controles em triplicata, assim como padrões adequados. Nesta fase a realização dos ensaios fornecerá um bom indicativo da precisão e acurácia do novo método. Entretanto, é fundamental, que os resultados estejam de acordo com o que se definiu nas etapas anteriores. A reavaliação do ensaio, no caso em que seja verificada a existência de alguma inconformidade, deve ocorrer neste ponto. O retorno para a etapa 2 deve ser compreendido como o processo de melhoria dos procedimentos e refinamento da metodologia, fundamentais para a obtenção de um ensaio biológico de confiança (VAN ZONEN *et al.*, 1999; SHABIR, 2007).

Apenas quando o método tiver sido desenvolvido com sucesso, isto é, apresentando todas as condições de ensaio bem definidas e sem a necessidade de modificações, é que os ensaios de validação propriamente ditos poderão ser realizados. Na etapa 4, portanto, serão selecionados e avaliados critérios de validação, cuja escolha deverá estar associada ao tipo de método utilizado. De forma geral, os critérios chave para a validação de um método analítico são: a) seletividade/ especificidade; b) limite de detecção; c) limite de quantificação; d) recuperação; e) faixa de trabalho e linearidade; f) acurácia; g) precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), e h) robustez. A aplicação ou não de cada um destes critérios vai depender do propósito e da natureza do método em desenvolvimento (VAN ZONEN *et al.*, 1999). Como exemplo, métodos que visem à determinação/ identificação de patógenos em amostras ambientais poderão dispensar a análise de critérios como limite de quantificação e linearidade; entretanto, outros critérios como especificidade, limite de detecção e robustez do método são essenciais para estes tipos de ensaios. É importante salientar, ainda, que tanto nesta etapa de definição dos critérios de validação, como naquelas anteriormente descritas, é fundamental que um programa QA/ QC seja seguido, garantindo a qualidade e idoneidade do novo ensaio desenvolvido (Seção 2.8).

O processo de validação, entretanto, não termina após a implantação do ensaio; este deve ser constantemente monitorado em relação às suas acurácia e precisão. Uma das principais formas de monitoramento utiliza testes de proficiência, em que diferentes laboratórios testam, simultaneamente, o mesmo conjunto de amostras, ensaiadas de acordo com o método avaliado. Caso se

verifique alterações nos critérios validados anteriormente, uma investigação para determinação do evento responsável por estas alterações, assim como medidas de correção de possíveis perturbações nos ensaios, devem ser colocadas em prática (EDERVEEN, 2010). Esta fase de monitoramento constante caracteriza a etapa 5 do processo de validação; um método desenvolvido deverá permanecer nesta etapa até que sejam definidas alterações que visem a melhoria dos ensaios. Nestes casos recomenda-se o retorno para a etapa 3 e a reavaliação do desempenho do método após a definição de novas condições de ensaio.

Diante do exposto, pode-se afirmar que um processo de validação envolve mais do que apenas a obtenção de critérios de desempenho; fundamentalmente trata-se de um processo complexo, em que etapas como a definição da aplicabilidade e a obtenção de condições ótimas de ensaios são essenciais para o seu sucesso. O desenvolvimento do novo método, portanto, deve ser cuidadosamente levado a efeito, buscando-se dados e informações que visem à melhor adequação da resposta àquilo a que se propõe investigar.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As metodologias adotadas para o desenvolvimento desta pesquisa foram separadas de acordo com os objetivos específicos propostos e são apresentadas a seguir. Os ensaios foram realizados nas instalações do Laboratório de Engenharia Ambiental Professor Francisco Borsari Netto (LBEAM/ UFPR) e do Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Saneamento (BIOSAN/ UFPR), Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

#### 3.1 AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA NA DETERMINAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE *Ascaris* EM LODO DE ESGOTO PELA METODOLOGIA USEPA (2003)

A acurácia (% de recuperação) do método para determinação e quantificação de ovos viáveis de *Ascaris* em amostras de lodo, adotado pela Resolução CONAMA nº 375/ 2006 (USEPA, 2003), foi avaliada pela realização de uma análise de QA-QC denominada de *split / spike*, utilizando-se diferentes matrizes de lodo de esgoto doméstico. Os ensaios *split/ spike*, também denominados de ensaios de recuperação, consistiram na adição de quantidades conhecidas de ovos de *A. suum* em amostras de lodo, verificando-se, posteriormente, a recuperação destes ovos pelo método avaliado. A seguir são descritos os ensaios realizados durante esta etapa.

##### 3.1.1 Amostragem de lodo de esgoto doméstico

Com o objetivo de realizar uma amostragem abrangente para a realização dos ensaios, coletas de lodos anaeróbio e aeróbio, ambos provenientes do tratamento de esgoto doméstico, foram realizadas. As amostras foram coletadas nas estações de tratamento de esgoto (ETEs) Atuba Sul e Belém, pertencentes à Companhia de Saneamento do Paraná- SANEPAR, e localizadas na região metropolitana da cidade de Curitiba, Paraná. Ao todo foram realizadas três campanhas de coletas, a saber: fevereiro, abril e junho de 2014.

As amostras coletadas consistiram em: a) lodo anaeróbio, originário de reator UASB (ETE Atuba Sul), e b) lodo aeróbio, originário do processo de lodos ativados com aeração prolongada (ETE Belém). Os lodos foram coletados após desaguamento em centrífuga. Considerou-se ainda a adição ou não de cal (CaO)



para higienização, totalizando quatro tipos de amostras (Quadro 3.1). A quantidade de cal adicionada foi definida pela Companhia de Saneamento do Paraná-SANEPAR, e seguiu a relação 1:1 (uma parte de cal para cada parte de sólidos totais do lodo, ou caleação a 50%), em um processo de tratamento conhecido como Estabilização Alcalina Prolongada (EAP) (BITTENCOURT *et al.*, 2014). Na Figura 3.1 a-d são apresentados os quatro pontos de coleta das amostras, e na Figura 3.2 a-d os diferentes tipos de lodo amostrados para este estudo.

QUADRO 3.1 –ORIGEM E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LODO ADOTADAS NESTE ESTUDO

ETE	Localização	Tecnologia de Tratamento de Esgoto	Lodo Gerado	Ponto de Coleta do Lodo	Código de Identificação (letras)
Atuba Sul	25°28'23"S 49°11'12"W	UASB <sup>1</sup>	Anaeróbio	Após centrifugação	AN
				Após centrifugação e caleação	AC
Belém	25°30'54"S 49°12'44"W	Lodos ativados com aeração prolongada	Aeróbio	Após centrifugação	BN
				Após centrifugação e caleação	BC

Notas: <sup>1</sup> *Upflow anaerobic sludge blanket reactor*, ou reator anaeróbio de manto de lodo

FONTE: O autor (2014)

A escolha das amostras baseou-se em três pontos principais, a saber:

- i. Necessidade de avaliar a acurácia das metodologias de quantificação de ovos viáveis de *Ascaris*, utilizando-se lodos com diferentes origens e características (i.e. anaeróbio e aeróbio), de acordo com as exigências de garantia de qualidade dos ensaios;
- ii. No Paraná, o tratamento de higienização do lodo adotado pela SANEPAR é a EAP. Desta forma, biossólidos disponibilizados para uso agrícola no estado irão conter cal em sua composição e a influência deste composto em relação à recuperação dos ovos de *A. suum* nas amostras precisa ser avaliada;
- iii. Ensaios que utilizam lodos sem caleação são importantes para avaliar a acurácia na quantificação de ovos de *A. suum* viáveis, antes e após processos de desinfecção.



FIGURA 3.1 – AMOSTRAGEM DE LODO: a) COLETA DE LODO CENTRIFUGADO-ETE BELÉM; b) SAÍDA DE LODO CENTRIFUGADO E CALEADO – ETE BELÉM; c) CENTRÍFUGA- ETE ATUBA SUL; d) SISTEMA PARA CALEAÇÃO DE LODO- ETE ATUBA SUL

FONTE: O autor (2014)

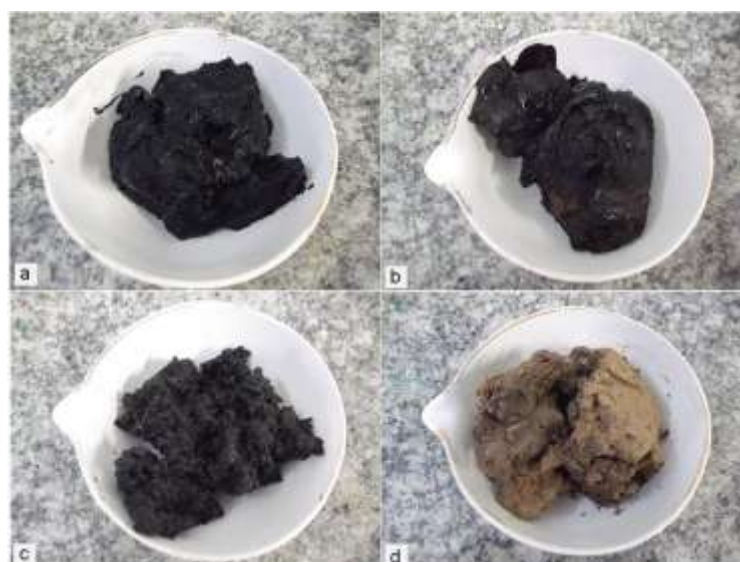


FIGURA 3.2 – TIPOS DE LODOS AMOSTRADOS: a) LODO ANAERÓBIO APÓS CENTRIFUGAÇÃO E SEM CALEAÇÃO (AN); b) LODO ANAERÓBIO CENTRIFUGADO E CALEADO (AC); c) LODO AERÓBIO APÓS CENTRIFUGAÇÃO E SEM CALEAÇÃO (BN); d) LODO AERÓBIO CENTRIFUGADO E CALEADO (BC)

FONTE: O autor (2014)

Visando ao controle das amostras avaliadas, foi adotado um código de identificação contendo duas letras e um número. Para amostras provenientes da ETE Atuba (lodo anaeróbio), a letra inicial adotada foi A; para aquelas coletadas na ETE Belém (lodo aeróbio), adotou-se a letra B. A segunda letra referiu-se ao processo de caleação. Amostras coletadas imediatamente após a centrifugação, sem adição de cal, foram nomeadas com a letra N. Já amostras centrifugadas e caleadas, receberam a letra C. Por fim, uma numeração de 1 a 3 foi adotada no final do identificador, referindo-se à campanha em que a amostra foi coletada. Como exemplo, um código de identificação AN1 refere-se à amostra proveniente da ETE Atuba Sul (lodo anaeróbio), após centrifugação, sem caleação e coletada durante a 1ª campanha realizada (fevereiro/ 2014).

Imediatamente após a coleta, as amostras foram armazenadas em refrigerador, a  $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A seguir foram realizados ensaios gravimétricos para a determinação da concentração de sólidos totais (ST) das amostras de lodo obtidas (APHA, 1998).

### **3.1.2 Aquisição de ovos viáveis de *Ascaris suum***

Ovos viáveis de *Ascaris suum* foram adquiridos da empresa Excelsior Sentinel (Ithaca, NY, EUA). A escolha dos ovos do parasita suíno baseou-se em três principais características deste organismo, a saber: i) apesar de potencial agente etiológico de quadros de zoonose em áreas agrícolas, a espécie *A. suum* apresenta baixa patogenicidade para humanos, quando comparada à espécie irmã *A. lumbricoides*; ii) As espécies de *Ascaris* são estrutural e geneticamente similares, e ambas podem ser utilizadas como modelo experimental do gênero, de acordo com o objetivo da pesquisa; e iii) ovos de *A. suum* são disponibilizados comercialmente, purificados e em concentração conhecida.

Os ovos de *Ascaris suum* foram fornecidos em suspensão aquosa tamponada contendo 0,5% de formalina, em concentração de  $4 \times 10^4$  ovos  $\text{mL}^{-1}$  e viabilidade aproximada de 90%. A suspensão de ovos, definida como suspensão padrão, foi armazenada a  $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A integridade dos ovos adquiridos foi verificada pela análise de alíquotas de 1 mL da suspensão em microscópio óptico, marca Olympus (Tóquio, Japão), modelo BX41. Na sequência, foram realizados ensaios de verificação da viabilidade dos ovos obtidos.

### 3.1.2.1 Teste de viabilidade

Para verificar a viabilidade dos ovos de *A. suum* fornecidos foram realizadas diluições seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  da suspensão padrão de ovos, utilizando-se solução de  $H_2SO_4$  0,1 N como diluente. As diluições tiveram como objetivo reduzir o número de ovos nas amostras, permitindo que a contagem microscópica deste material fosse realizada com maior acurácia. Na sequência, alíquotas contendo 4 mL das amostras diluídas foram incubadas em estufa microbiológica, a  $28^{\circ}C$ , por 21 dias.

Após o período de incubação, as amostras foram analisadas em microscópio óptico marca Olympus (Tóquio, Japão), modelo BX-41, utilizando-se câmara de Sedwick-Rafter. Durante a análise, ovos contendo apenas uma célula foram considerados inviáveis e ovos em desenvolvimento embrionário avançado (estágios de blástula ou gástrula), ou em fase larval, foram definidos como viáveis.

### 3.1.3 Inoculação e recuperação de ovos viáveis de *A. suum* nas amostras de lodo: ensaios *split/ spike*

Após as etapas de amostragem de lodo, aquisição e verificação da qualidade dos ovos de *A. suum*, foram realizados ensaios de inoculação e recuperação de ovos do parasita no lodo (ensaios *split/ spike*).

Inicialmente, cada amostra de lodo coletada era esterilizada por autoclavação, a  $121^{\circ}C$  e  $1,05\text{ kg/cm}^2$ , por 1 h (MAYA *et al.*, 2012). Após a esterilização, alíquotas em triplicata das amostras eram inoculadas com ovos de *Ascaris suum*. Para os ensaios realizados neste estudo, três concentrações de ovos de *A. suum* foram utilizadas como inóculo, a saber: 10 ovos/ g ST, estabelecido como limite de concentração de ovos de helmintos em amostras de lodo de esgoto classe B (como apresentado anteriormente, a classe não está mais vigente para aplicação agrícola no Brasil); 1 ovo/ g ST, como concentração intermediária; e 0,25 ovo/ g ST, que é o valor limite especificado pela Resolução CONAMA (2006) para lodos classe A, com potencial de uso na agricultura.

Para a inoculação, 100 g de lodo autoclavado eram dispostos em béquer, onde era adicionada a quantidade de ovos de *A. suum* necessária à obtenção da concentração desejada. Como exemplo, uma amostra de lodo contendo 20% de sólidos totais (20 g de ST/ 100g de amostra) deveria ser inoculada com 200 ovos,

caso se desejasse atingir a concentração final de 10 ovos/ g ST. A quantidade de ovos requerida como inóculo era obtida a partir de diluições da suspensão padrão de ovos de *A. suum*. Previamente à inoculação, a quantidade de ovos, presente na alíquota a ser utilizada, era verificada por microscopia óptica.

Após a inoculação, as amostras eram processadas de acordo com a metodologia de quantificação de ovos viáveis de helmintos adotada pela Resolução CONAMA nº 375/ 06, ou seja, aquela especificada pela *United States Environmental Protection Agency- USEPA* (2003). Paralelamente, amostras controle, isto é, contendo lodo autoclavado sem a adição de ovos de *Ascaris*, eram processadas também em triplicata, seguindo a mesma metodologia aplicada às amostras inoculadas. As principais etapas da metodologia USEPA (2003) utilizada para o processamento das amostras, podem ser visualizadas na Figura 3.3. O tempo aproximado de processamento completo de uma amostra, excluindo-se o tempo de incubação, era de 2 dias, dependendo do tipo de amostra e da habilidade do analista. O protocolo detalhado do procedimento, assim como os reagentes e equipamentos necessários para sua realização, encontra-se descrito no Anexo A. É importante salientar que o método da USEPA (2003) aplica-se apenas ao isolamento e purificação de ovos de *Ascaris*. Apesar de possibilitar o isolamento de outras espécies de parasitas, como *Taenia* sp., *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos, as etapas deste métodos foram otimizadas para a recuperação de ovos do indicador *Ascaris*, não havendo garantias de adequada recuperação e purificação para outras espécies de helmintos.

Após o processamento, as amostras eram incubadas a 28 °C, por 21 dias. Durante este período, o volume de solução era monitorado e os tubos contendo as amostras eram mantidos com tampas soltas para permitir a aeração dos meios. Ao final do período de incubação, a quantificação dos ovos viáveis recuperados em cada replicata era realizada por análise microscópica (microscópio Olympus, modelo BX41, aumento de 100 X).

A acurácia, na forma de porcentagem de recuperação dos ovos inoculados, era obtida pela quantidade de ovos de *A. suum* observada nas amostras em microscopia óptica após a incubação, descontada a quantidade de ovos observada na amostra controle, dividida pela quantidade total de ovos inoculados, e multiplicada por 100 (Equação 3.1):

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{n^{\circ} \text{ ovos recuperados} - n^{\circ} \text{ ovos no controle}}{n^{\circ} \text{ ovos inoculados}} \times 100 \quad (3.1)$$

A porcentagem de viabilidade dos ovos recuperados, por sua vez, era obtida dividindo-se a quantidade observada de ovos viáveis multiplicada por um fator 1,14, pela quantidade total de ovos, e multiplicada por 100 (Equação 3.2):

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{n^{\circ} \text{ de ovos viáveis observados} \times 1,14}{n^{\circ} \text{ total de ovos observados}} \times 100 \quad (3.2)$$

O fator de multiplicação adotado refere-se à correção da viabilidade inicial dos ovos inoculados, considerada igual a 86% (14% de inviáveis, portanto), de acordo com os ensaios de viabilidade realizados com a suspensão padrão (Seção 3.1.2.1). O objetivo da determinação da porcentagem da viabilidade, expressa pela Equação 3.2, era verificar a influência do meio (lodo) no desenvolvimento dos ovos, ou seja, a potencial inativação de ovos originalmente viáveis. Assim, justifica-se a adoção do fator de correção na Equação 3.2, pois deve-se desconsiderar no cálculo os ovos que já se encontravam inviáveis no inóculo.

Na Figura 3.4 é apresentada uma representação esquemática geral dos ensaios *split/ spike* realizados para recuperação dos ovos de *Ascaris* inoculados em amostras de lodo.

### 3.2 UTILIZAÇÃO DA RT-qPCR PARA A DETERMINAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE *A. suum* EM LODO DE ESGOTO

O segundo objetivo específico desta pesquisa envolveu a utilização da técnica da RT-qPCR para a determinação de ovos viáveis de *A. suum* em amostras de lodo de esgoto. Para tanto, considerando que o desenvolvimento de um novo ensaio biológico demanda investigação adequada do organismo ou molécula de interesse, tornou-se necessária a realização de ensaios morfológicos, estruturais e de desenvolvimento do parasita *Ascaris*. A seguir, são apresentadas as metodologias adotadas durante esta etapa da pesquisa, divididas em: a) análise morfológica e ultraestrutural de ovos de *A. suum*; b) acompanhamento da embriogênese de *Ascaris*; c) desenvolvimento e avaliação de ensaio molecular para determinação de ovos viáveis de *Ascaris*; e d) determinação de ovos viáveis de *Ascaris suum* em amostras de lodo de esgoto utilizando-se ensaio molecular desenvolvido.



FIGURA 3.3 - PRINCIPAIS ETAPAS DA METODOLOGIA USEPA (2003) PARA QUANTIFICAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE *Ascaris* EM LODO: a) 100 g DE AMOSTRA, EM TRIPLICATA, PARA ADIÇÃO DE INÓCULO; b) AMOSTRAS IMERSAS EM ÁGUA DEIONIZADA (14-16 HORAS); c) ROMPIMENTO DE GRÂNULOS POR LIQUIDIFICAÇÃO; d) ETAPA DE SEDIMENTAÇÃO A 4°C, COM DETERGENTE 7X; e) AMOSTRAS SEDIMENTADAS (SÓLIDOS DE FUNDO); f) REMOÇÃO DO SOBRENADANTE POR ASPIRAÇÃO A VÁCUO; g) PENEIRAMENTO 50 mesh (0,3 mm) COM RECUPERAÇÃO DO FILTRADO; h) AMOSTRA CENTRIFUGADA COM SULFATO DE MAGNÉSIO ( $d= 1.2 \text{ g/mL}$ ) (RECUPERAÇÃO DO SOBRENADANTE); i) PENEIRAMENTO 400 mesh (0,04 mm) COM RECUPERAÇÃO DO RETIDO (SETAS). APÓS ESTA ETAPA, OS SEDIMENTOS RECUPERADOS SÃO INCUBADOS EM SOLUÇÃO  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1N, A 28 °C, POR 21 DIAS

FONTE: O autor (2014)

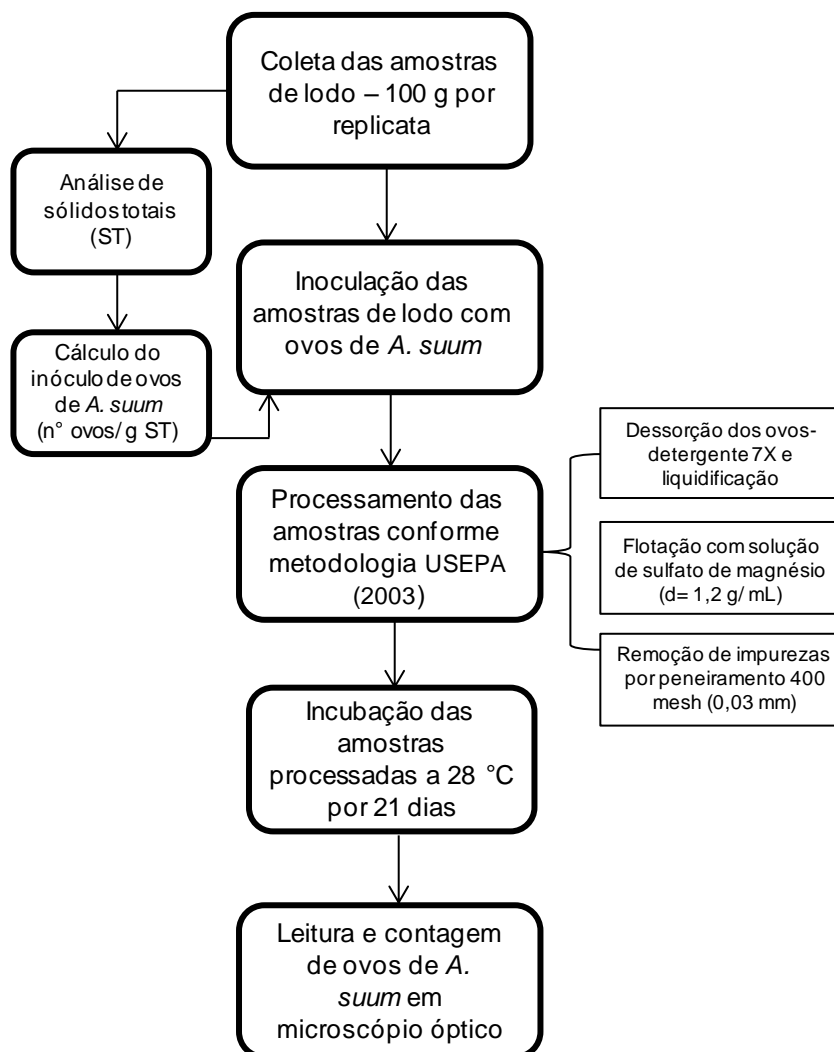


FIGURA 3.4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DO ENSAIO CONVENCIONAL DE RECUPERAÇÃO DE OVOS DE *Ascaris suum* INOCULADOS EM AMOSTRAS DE LODO DE ESGOTO

FONTE: O autor (2015)

### 3.2.1 Análise morfológica e ultraestrutural dos ovos de *A. suum*

Com o objetivo de avaliar a morfologia e estrutura dos ovos de *A. suum*, ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram realizados.

Para o preparo das amostras visualizadas em MEV, 1 mL de suspensão de ovos de *A. suum*, contendo aproximadamente  $8 \times 10^3$  ovos, foi filtrada a vácuo em filtro faixa branca, com diâmetro de poro de 25  $\mu\text{m}$ . Após a filtração, o papel filtro contendo os ovos, foi cortado em seções menores (0,5 cm x 0,5 cm), que a seguir foram fixadas (14 a 16h) em solução de Karnovsky (paraformaldeído 1%,



glutaraldeído 3%, cacodilato de sódio 0,07 M). Após a fixação inicial, as seções de filtro foram lavadas em solução tampão fosfato 0,2 M, pH 7,3. A seguir, uma etapa de fixação secundária por 2 h com solução 1% de tetróxido de ósmio (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) foi realizada. A esta etapa seguiu-se nova lavagem em tampão fosfato e, na sequência, a desidratação das amostras em série alcoólica crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) foi realizada.

Após a imersão em álcool absoluto, foi realizada a desidratação das amostras em equipamento Ponto Crítico, marca Bal-Tec, (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) modelo CPD-030. A seguir, as amostras foram metalizadas em metalizador marca Balzers (Oerlikon Balzers, Liechtenstein), modelo SCD030.

Após o preparo, as amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura, marca TESCAN (Brno-Kohoutovice, República Tcheca), modelo Vega 3. A captura das imagens da varredura foi realizada utilizando-se o software Vega TC (TESCAN).

No processamento das amostras para visualização em MET, 1 mL de suspensão contendo, aproximadamente,  $8 \times 10^3$  ovos de *A. suum* foi centrifugado a  $3500 \times g$ , por 5 min, em centrífuga marca Celm (Barueri, São Paulo), modelo LS-3 Plus. O sedimentado formado foi fixado em solução de tetróxido de ósmio 1%, por 2 h. A seguir foi realizada a desidratação das amostras em série alcoólica crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). As amostras foram gradativamente incluídas em resina Spurr<sup>®</sup> de baixa viscosidade (*Spurr low-viscosity embedding kit*- Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), sendo 1 parte de resina : 1 parte de álcool por 30 min; 2 partes de resina : 1 parte de álcool por 30 min; e resina pura. Após imersão em resina pura, as amostras foram dispostas em tubos de 0,2 mL e incubadas em estufa marca Odontobrás, modelo EL- 1.1, a 70 °C, por 18 h.

Após incubação, os blocos de resina formados foram cortados em equipamento ultramicrotomo, marca Leica (Wetzlar, Alemanha), modelo Ultra-Cut. Os cortes ultra-finos obtidos foram contrastados com acetato de uranila (4%) e solução de citrato de chumbo (0,4%) e visualizados em microscópio eletrônico de transmissão, marca JEOL (Tóquio, Japão), modelo 1200EXII. A captura das imagens de transmissão foi realizada utilizando-se o software Gatan Digital Micrograph (JEOL), versão 2.x.

### 3.2.2 Acompanhamento da embriogênese de *A. suum*

Visando ao monitoramento das fases do desenvolvimento embrionário de *Ascaris*, amostras da suspensão padrão de ovos de *A. suum* foram diluídas 25 e 125 vezes com solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 N, obtendo-se, respectivamente, suspensões com concentrações de 1600 ovos  $\text{mL}^{-1}$  e 320 ovos  $\text{mL}^{-1}$ . A seguir, tubos tipo Falcon contendo estas suspensões, em triplicata, foram incubados em estufa microbiológica, a 28 °C. O objetivo das diferentes concentrações foi verificar se a quantidade de ovos no meio influencia o tempo de desenvolvimento embrionário de *Ascaris*.

Diariamente, durante o período de 21 dias, uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de cada suspensão era coletada dos tubos e analisada em microscopia óptica (microscópio Olympus, modelo BX41, aumento de 100 X e 200 X). Durante a análise microscópica, determinava-se o estágio embrionário dos primeiros 30 ovos visualizados, provenientes de cada alíquota. Os seguintes estágios foram monitorados durante a embriogênese de *A. suum*: 1 célula; 2 células; 3 células; 4 células; mórula inicial ( 5 a 10 células); mórula tardia; blástula, gástrula, larva 1 e larva 2. Os ovos em desenvolvimento foram fotografados em câmera marca Fujifilm, modelo Finepix AV.

#### 3.2.2.1 Avaliação dos ensaios da embriogênese: tabelas de vida e teste de Mantel

Com o objetivo de determinar a dinâmica da primeira divisão celular no interior do ovo de *Ascaris*, isto é, o início da embriogênese considerando-se diferentes concentrações, tabelas de vida de coorte foram construídas, utilizando-se os dados obtidos durante observação microscópica.

Uma tabela de coorte é uma ferramenta da ecologia populacional bastante útil para acompanhamento da dinâmica de crescimento de uma população, e faz uso de conceitos como taxas de natalidade, mortalidade e crescimento. Neste estudo, foram adotados conceitos similares, porém adaptados de acordo com o objetivo do ensaio, que é o acompanhamento da quantidade de ovos de *Ascaris* que darão início à embriogênese ao longo do tempo. O Quadro 3.2 apresenta as variáveis utilizadas para o desenvolvimento das tabelas de vida de *Ascaris*, sua definição da ecologia populacional e as adaptações realizadas para sua utilização

na investigação da dinâmica da embriogênese do parasita.

QUADROS 3.2 – VARIÁVEIS UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DE TABELAS DE VIDA NA ECOLOGIA POPULACIONAL E SUA ADAPTAÇÃO PARA OS ENSAIOS DE EMBRIOGÊNESE DE *A. suum*

Variável	Conceito	
	Geral	Adaptado <sup>1</sup>
x	Classe da idade (anos, meses, dias)	Dias de incubação dos ovos de <i>A. suum</i>
N <sub>x</sub>	Número de indivíduos vivos na idade x	Número de ovos não embrionados com x dias de incubação
l <sub>x</sub>	Proporção de indivíduos vivos na idade x $l_x = N_x / N_0$	Proporção de ovos não embrionados com x dias de incubação
d <sub>x</sub>	Número de indivíduos mortos entre x e (x+1) $d_x = N_x - N_{x+1}$	Número de ovos embrionados no intervalo entre x e (x+1) dias
q <sub>x</sub>	Probabilidade de um indivíduo morrer entre x e (x+1) $q_x = (N_x - N_{x+1}) / N_x$	Probabilidade de um ovo embrionar entre x e (x+1) dias
p <sub>x</sub>	Probabilidade de um indivíduo sobreviver entre x e (x+1) $p_x = 1 - q_x$	Probabilidade de um ovo não embrionar entre x e (x+1) dias

Notas: <sup>1</sup>Adaptado para construção de tabela de vida de início da embriogênese de ovos de *A. suum*; N<sub>0</sub> – Número inicial de indivíduos ou ovos

FONTE: O autor (2015)

Também nesta etapa, os ensaios da embriogênese de *Ascaris*, realizados nas concentrações de 1600 ovos mL<sup>-1</sup> e 320 ovos mL<sup>-1</sup>, foram avaliados utilizando-se o teste bioestatístico de Mantel. O teste de Mantel investiga a correlação e a significância estatística entre duas matrizes e comumente é aplicado entre uma matriz de distância genética e uma de distância espacial (euclidiana). Para a avaliação dos ensaios de embriogênese, entretanto, adaptou-se o teste de Mantel para a utilização de outras matrizes, considerando-se cada concentração de ovos independentemente: a) matriz de distância ou variação *ontogenética*, em que cada dia de embriogênese encontra-se associado a uma distribuição distinta de fases

de desenvolvimento do parasita; e b) matriz de distância *temporal*, em que as variações de posições geográficas definidas originalmente no teste dão lugar às variações no tempo, ao longo dos dias de embriogênese de *Ascaris*.

Os resultados da embriogênese de ambas as concentrações de ovos foram avaliados utilizando-se o teste de Mantel de maneira independente. Para a realização do teste, ambas as matrizes (ontogenética e temporal) foram definidas com 21 colunas, cada uma referente a um dia da embriogênese. Na matriz de variação ontogenética, cada coluna continha a distribuição de fases da embriogênese referente ao respectivo dia de desenvolvimento, enquanto que a matriz temporal apresentava a distância, em dias, entre cada distribuição.

O teste de Mantel foi realizado utilizando-se o *software* BioEstat<sup>®</sup>, versão 5.0, com um intervalo de confiança de 95%.

### **3.2.3 Padronização do ensaio molecular para determinação de ovos viáveis de *Ascaris* em lodo de esgoto**

Visando à definição das melhores condições de ensaio para a determinação de ovos viáveis de *Ascaris*, métodos biomoleculares foram avaliados durante o desenvolvimento deste estudo, a saber: a) indução do desenvolvimento larval em ovos de *A. suum*; b) lise celular dos ovos de *A. suum*; c) isolamento e purificação do material genético (RNA) presente nos ovos de *Ascaris*; d) obtenção de cDNA a partir das amostras de RNA isoladas; e e) amplificação do cDNA obtido por PCR em tempo real (qPCR).

#### **3.2.3.1 Indução do desenvolvimento larval em ovos de *Ascaris suum***

Com o objetivo de induzir o desenvolvimento larval e, com isso, a síntese de RNA nos ovos de *Ascaris*, suspensões em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N contendo: a) 8000 ovos mL<sup>-1</sup>; b) 1600 ovos mL<sup>-1</sup>; c) 320 ovos mL<sup>-1</sup> e d) 64 ovos mL<sup>-1</sup> foram incubadas, em triplicata, em estufa microbiológica, a 28 °C, por 3 dias. Paralelamente, outros dois conjuntos de amostras, contendo as mesmas concentrações, foram mantidos em incubação a 28 °C, por 7 e 21 dias, respectivamente.

#### **3.2.3.2 Lise celular dos ovos de *Ascaris suum***

Para a liberação do conteúdo citoplasmático das células presentes nos ovos

de *Ascaris* para posterior isolamento do RNA total presente nas células, diferentes técnicas de lise celular foram avaliadas, a saber: a) lise química com uso de reagentes que interferem na integridade da membrana dos ovos; b) lise enzimática com soluções de proteinase K e lisozima; e c) três diferentes técnicas de lise mecânica, utilizando-se ultrassom, nitrogênio líquido e micropérolas de vidro. Todos os ensaios descritos a seguir foram conduzidos em triplicata.

#### 3.2.3.2.1 *Via Química*

No processo de lise celular por via química, 1 mL de cada suspensão descrita no item 3.2.3.1 foi centrifugada em centrífuga marca Celm, modelo LS-3 Plus, a 3400 x g, por 5 min. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o sedimentado foi disposto em um béquer de 10 mL, onde foram adicionados 3 mL de solução NaOH 0,5 N. Os béqueres contendo os ovos foram, então, incubados com agitação constante, a 4 °C, por 12 h. Após este período, as suspensões de ovos foram dispostas em tubos tipo Falcon e centrifugadas a 3400 x g, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e ao sedimentado foram adicionados 5 mL de solução NaClO 4%. Após 1 min em temperatura ambiente, a suspensão foi novamente centrifugada, o sobrenadante descartado e nova alíquota de 5 mL de solução NaClO 4% adicionada sobre o sedimentado. Após 10 min, as suspensões foram agitadas, invertendo-se os tubos por 4 vezes. Na sequência, foram realizadas cinco lavagens do sedimentado com água deionizada, intercaladas com etapas de centrifugação e remoção do sobrenadante. Após a última lavagem, 400 µL de solução tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) foram adicionados sobre o sedimentado que, a seguir, foi macerado por 1 min com o auxílio de um bastão de vidro. Ao final do procedimento, 50 µL da suspensão foram observados em microscópio óptico, marca Olympus, modelo BX-41, em aumento de 200 X.

#### 3.2.3.2.2 *Via Enzimática*

Para avaliar a eficiência da lise dos ovos de *A.suum* por processo enzimático, 1 mL de cada suspensão de ovos descrita no item 3.2.3.1 foi centrifugada a 3400 x g, por 5 min, utilizando-se tubos de 15 mL tipo Falcon. Após o descarte do sobrenadante, o sedimentado obtido foi transferido para um tubo tipo Eppendorf, onde foram adicionados 400 µL de solução tampão TE. O

sedimentado foi então ressuspensionado, utilizando-se equipamento vórtex marca Biomixer (Westlake Village, EUA), modelo QL-901 e, a seguir, 20 µL de solução de proteinase K (SDS 10%, EDTA 0,4 M pH 8 e 2 mg mL<sup>-1</sup> proteinase K) foram adicionados aos tubos que, a seguir, foram mantidos em banho Maria marca Nova Ética (São Paulo, Brasil), modelo 314/8, a 65 °C, por 10 min.

Após o período de incubação, 50 µL de lisozima 10 mg L<sup>-1</sup> (Axygen, Union City, EUA) foram adicionados ao tubo. Após nova homogeneização com vórtex, os tubos foram mantidos em estufa, a 37 °C, por 12 h. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 12.000 x g, em microcentrífuga marca Sigma (Osterode am Harz, Alemanha), modelo 1-14. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado ressuspensionado em 400 µL de solução tampão TE. Ao final do procedimento, 50 µL da suspensão foram observados em microscópio óptico, marca Olympus, modelo BX-41, em aumento de 200 X.

#### 3.2.3.2.3 Via Mecânica

Os processos de lise celular dos ovos de *A. suum* por via mecânica, avaliados durante este estudo, foram: i) ultrassonicação; ii) choque térmico, com uso de nitrogênio líquido, e iii) lise por micropérolas de vidro, com 0,1 mm de diâmetro.

Para avaliar os três processos de lise mecânica, 1 mL de cada suspensão de ovos ( item 3.2.3.1) foi transferido para tubo tipo Falcon e centrifugado a 3400 x g, por 5 min. A seguir, o sobrenadante foi descartado e os sedimentados obtidos foram ressuspensionados utilizando-se 400 µL de solução tampão TE. Na sequência, procedeu-se de acordo com cada técnica de lise a ser avaliada.

Para a técnica de ultrassonicação, as amostras foram transferidas para tubos de vidro com capacidade de 10 mL e dispostas em equipamento ultrassonicador, marca Unique (Indaiatuba, Brasil), modelo Ultracleaner 1400. A seguir foram submetidas a ondas ultrassônicas de 40 kHz, por 30 min. Ao final do procedimento, 50 µL da suspensão foram observados em microscópio óptico, marca Olympus, modelo BX-41, em aumento de 200 X.

Visando à avaliação da eficiência do choque térmico para lise celular dos ovos de *A. suum*, tubos contendo as amostras em solução tampão TE foram submersos em nitrogênio líquido por 3 min, e imediatamente descongelados em banho-maria, marca Nova Ética, modelo 314/8 a 65°C, por 5 min. Este ciclo de

congelamento/ descongelamento foi repetido por três vezes. Após o último ciclo, 50  $\mu$ L da suspensão foram observados em microscópio óptico, marca Olympus, modelo BX-41, em aumento de 200 X.

Para a lise celular utilizando-se micropérolas de vidro, as suspensões em tampão TE foram transferidas para tubos tipo Eppendorf, onde foram adicionados 1 mg de micropérolas de vidro, com diâmetro de 0,1 mm (BioSpec, Bartlesville EUA)(Figura 3.5). A seguir, os tubos contendo as amostras foram centrifugados em microcentrífuga marca Sigma, modelo I-14, a 4500 x g, por 45 s. O sedimentado obtido foi novamente ressuspensionado e 50  $\mu$ L da suspensão foi observada em microscópio óptico, marca Olympus, modelo BX-41, aumento de 200 X.



FIGURA 3.5 – MICROPÉROLAS DE VIDRO PARA LISE MECÂNICA DE CÉLULAS DE *A. suum*: a) FRASCO DE 500 g COMERCIALIZADO (BIOSPEC); b) MICROPÉROLAS DE VIDRO (0,1 mm DE DIÂMETRO)

FONTE: O autor (2014)

### 3.2.3.3 Extração e purificação de RNA dos ovos de *A. suum*

Após a definição da técnica de lise celular mais adequada às amostras, dois protocolos de extração e purificação de RNA dos ovos de *A. suum* foram avaliados: a) método do fenol-guanidina (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 2006); e b) extração por kit comercial *AxyPrep Multisource total RNA mini-prep kit*<sup>®</sup> (Axgen). Os ensaios foram realizados com as concentrações de ovos descritas na Seção 3.2.3.1 e após os procedimentos de lise celular utilizando micropérolas de vidro (Seção 3.2.3.2.3). Todo o material plástico utilizado nos ensaios de extração de RNA era livre de RNAses, e as vidrarias e soluções foram tratadas com

dietilpirocarbonato (DEPC) 0,5%, seguido de autoclavação, previamente ao uso.

No método do fenol-guanidina, 400  $\mu$ L de cada suspensão de ovos após a lise foram transferidos a um tubo tipo Falcon de 15 mL, onde adicionou-se 1 mL de solução D (tiocianato de guanidina 4 M; citrato de sódio 25 mM pH 7,0; sarcosil 0,5% e 2-mercaptoetanol 0,1 M). Após homogeneização em vórtex, marca Biomixer, modelo QL-901, adicionou-se aos tubos 0,3 mL de solução de acetato de sódio 2 M, pH 4,0. Na sequência, após homogeneização manual, foi realizada a adição de 3 mL de fenol saturado em água e 0,6 mL de clorofórmio, seguida de agitação manual vigorosa. Os tubos foram mantidos em gelo, por 15 min e, após este período, foram centrifugados a 3400 x g, por 60 min, em centrífuga marca Celm, modelo LS-3 Plus. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para tubos tipo Eppendorf, evitando o contato com a interfase formada. Na sequência, adicionou-se 1 mL de isopropanol para cada 1 mL de amostra transferida. A seguir, os tubos foram incubados a -20 °C, por 1 h e, após este período, foram centrifugados a 10.000 x g, por 15 min, em microcentrífuga marca Sigma, modelo I-14. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado lavado com 1 mL de etanol 70%. Após nova centrifugação a 10.000 x g, por 15 min, o sedimentado (RNA) foi seco a temperatura ambiente, por 10 min. O RNA obtido foi dissolvido utilizando-se 50  $\mu$ L de água estéril e livre de RNAses, em estufa de secagem marca Lucadema, modelo 82/100, a 60 °C, por 15 min. Paralelamente, outra suspensão de RNA foi obtida, dissolvendo o sedimentado seco em 20  $\mu$ L de água estéril e livre de RNAses e seguindo as mesmas condições de incubação, visando à obtenção de uma solução mais concentrada.

A extração de RNA pelo kit *AxyPrep Multisource total RNA mini-prep kit*<sup>®</sup> (Axgen) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se o protocolo para purificação de RNA total a partir de tecidos vegetais, fornecido juntamente com as instruções de uso do kit. A etapa de purificação em coluna (*spin/vac column*, fornecida no kit) foi realizada em microcentrífuga, marca Sigma, modelo I-14. Ao final do procedimento de purificação, o sedimentado de RNA foi ressuscitado em 50  $\mu$ L ou 20  $\mu$ L de tampão TE, obtendo-se duas concentrações distintas do material.

Em ambos os protocolos (método do fenol-guanidina e por kit de extração), imediatamente após a extração, uma alíquota de 5  $\mu$ L foi separada em tubo de 0,2 mL para leitura em equipamento NanoDrop, marca ThermoScientific (Waltham,



MA, EUA), modelo 2000C. O restante da amostra foi utilizada como alvo em uma reação de transcriptase reversa, para obtenção do cDNA de *Ascaris suum*.

#### 3.2.3.4 Síntese do cDNA de *A. suum*

O DNA complementar (cDNA) de *A. suum* foi obtido pela reação da transcriptase reversa, utilizando-se como molde o RNA obtido na etapa anterior (Seção 3.2.3.3).

A reação da transcriptase reversa foi realizada utilizando-se o kit *cDNA Reverse Transcriptase kit*<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e em equipamento termociclador, marca Biosystems (Curitiba, Brasil), modelo Biocycler MG25+. As condições de ciclagem foram: 25 °C por 10 min; 37 °C por 120 min, e 85 °C por 5 min.

#### 3.2.3.5 Amplificação de cDNA de *A. suum*

Os ensaios descritos a seguir referem-se à etapa de amplificação do cDNA obtido visando: a) verificação da presença de *Ascaris* na amostra pela técnica da PCR convencional; e b) amplificação do cDNA de interesse por PCR em tempo real (qPCR), utilizando como alvo o gene *alep1*.

##### 3.2.3.5.1 PCR convencional

O cDNA obtido das amostras foi utilizado como molde para a PCR convencional, utilizando-se um conjunto de iniciadores para o gene mitocondrial do citocromo b (*mt-cytB*) de *Ascaris*. Os iniciadores foram sintetizados pela empresa Invitrogen (*Life Technologies*, Carlsbad, EUA) e apresentam as sequências: GTTAGGTTACCGTCTAGTAAGG, para o iniciador *forward*; e CACTCAAAAAGGCCAAAGCACC, para o iniciador *reverse* (LOREILLE *et al.*, 2001). O tamanho de fragmento esperado para a reação de amplificação era de 142 pares de base (pb).

A reação da PCR foi realizada em equipamento termociclador marca Biosystem, modelo Biocycler MG25+, em um volume final de reação de 25 µL, contendo: tampão da Taq-polimerase 10 X; 25 mM de MgCl<sub>2</sub>; 2 mM de dNTPs ;8 pmol/ µL de cada iniciador; 1 U/ µL de Taq-polimerase; água livre de RNase e 2 µL do cDNA extraído. Reações contendo água no lugar do cDNA foram utilizadas

como controles negativos.

Para ambos iniciadores, a seguinte condição de PCR foi utilizada: 95 °C por 10 min, e 50 ciclos de 95 °C por 1 min, 52 °C por 45 s e 72 °C por 45 s. Ao final da amplificação, para avaliar a qualidade da PCR e verificar a presença de fragmentos amplificados, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2%, 100 V, por 1 h.

#### 3.2.3.5.2 Amplificação em tempo real (qPCR)

As amostras de cDNA obtidas a partir das metodologias de extração do RNA das quatro concentrações de ovos de *A. suum* ensaiadas (Seção 3.2.3.1) foram utilizadas em ensaios de PCR quantitativa (qPCR- Taqman<sup>®</sup>), visando à determinação de ovos viáveis de *Ascaris* e avaliação de uma potencial curva de calibração do método.

Os iniciadores utilizados no ensaio da qPCR foram definidos de modo a reconhecer e amplificar a sequência do cDNA de *alep1* (Figura 2.11). As sequências oligonucleotídicas dos iniciadores e sonda foram obtidas de forma otimizada utilizando-se o software *Primer Express*<sup>®</sup> versão 3.0 (Applied Biosystems). O Quadro 3.3 apresenta as sequências 5'-3' dos iniciadores e da sonda utilizados durante este estudo. A sonda contém o fluoróforo FAM e o *quencher* MGB (*minor groove binder*). Os iniciadores e sonda TaqMan<sup>®</sup> foram sintetizados e comercializados pela empresa Applied Biosystems (Carlsbad, EUA).

As amostras de cDNA foram amplificadas em equipamento SDS *Real-Time 7500 Fast* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em triplicata e em volume final de 25 µL, contendo: os reagentes para a amplificação (*Taq 2X Master Mix*); 900 nM de cada iniciador; 250 nM da sonda; 5 µL do DNA alvo e água livre de RNAses. As reações foram realizadas em placa contendo 96 poços para reação (*MicroAmp*<sup>®</sup> *Optical 96-Well Reaction Plate* - Applied Biosystems).

QUADRO 3.3 – SEQUÊNCIAS OLIGONUCLEOTÍDICAS DOS INICIADORES *FORWARD* E *REVERSE* E DA SONDA PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA DE ALEP1 POR qPCR

Iniciador (qPCR)	Sequência (5'- 3')
<i>Forward</i> ALEP1	CCGGCTCGGTAATCCGTAA
<i>Reverse</i> ALEP1	TTCTGCACCCATTTGATTGC
Sonda ALEP1	<u>FAM</u> CCCTGCAGACACT <u>CMGB</u>

FONTE: O autor (2012)

Para amplificação do cDNA alvo, as seguintes condições de ciclo foram utilizadas: 50 °C - 2 min; 95 °C - 10 min; e 50 ciclos de 95 °C - 15 seg e 60 °C - 1 min. Após a reação de amplificação, os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o Software 7500 v. 2.0.5.

Um segundo conjunto de sonda e iniciadores para ensaio de qPCR foi utilizado, visando à amplificação do cDNA obtido a partir do RNA ribossomal ITS1 (*Internal transcribed spacer 1*) de *Ascaris* (PECSON *et al.*, 2007). A resposta do cDNA de ITS1 ao ensaio de amplificação foi comparada à resposta obtida pelo cDNA de alep1. Assim, foi possível acompanhar a resposta de duas classes de RNA ao ensaio desenvolvido: o RNA mensageiro de alep1 e o RNA ribossomal de ITS-1.

O cDNA das amostras de ITS-1 foi obtido conforme metodologia descrita na Seção 3.2.3.4, e amplificado em equipamento SDS *Real-Time 7500 Fast* (Applied Biosystems). As sequências 5'-3' de sonda e iniciadores utilizadas neste ensaio encontram-se no Quadro 3.4. As concentrações de reagentes e condições de amplificação seguiram aquelas descritas para a amplificação do cDNA de alep1.

QUADRO 3.4 – SEQUÊNCIAS OLIGONUCLEOTÍDICAS DOS INICIADORES *FORWARD* E *REVERSE* E DA SONDA PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA DE ITS1 POR qPCR

Iniciador (qPCR)	Sequência (5'- 3')
<i>Forward</i> ITS1	TGCACATAAGTACTATTTGCGCGTAT
<i>Reverse</i> ITS1	TGATGTAATAGCAGTCGGCGG
Sonda ITS1	<u>FAM</u> CGTGAGCCACATAGTAAATTGCACACAAATGT <u>TAMRA</u>

FONTE: Pecson *et al.* (2006)

### 3.2.4 Determinação de ovos viáveis de *Ascaris suum* em amostras de lodo de esgoto por ensaio molecular

A técnica da RT-qPCR padronizada com os ovos de *A. suum* purificados foi utilizada para determinação de ovos viáveis do parasita nas amostras de lodo aeróbio e anaeróbio coletadas.

Simultaneamente ao processamento das amostras de lodo para determinação da recuperação de ovos de *A. suum* inoculados, utilizando-se o método de contagem microscópica descrito na Seção 3.1.3, outros conjuntos de amostras em triplicata e com as mesmas concentrações inoculadas de ovos foram processadas, utilizando-se, também, a metodologia definida pela USEPA (2003). Entretanto, após processamento, as amostras foram incubadas por 3 dias, em temperatura de 28 °C.

Após o período de incubação, as amostras foram processadas para extração do RNA total e obtenção do cDNA, de forma idêntica ao que foi apresentado nas Seções 3.2.3.3 e 3.2.3.4. O cDNA obtido foi utilizado como alvo para a qPCR em equipamento *Real-Time 7500 Fast* (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo descrito na Seção 3.2.3.5.2 e utilizando-se o cDNA do gene *alep1* como alvo. Na Figura 3.6 é apresentado um diagrama do ensaio molecular desenvolvido e utilizado para determinação de ovos viáveis de *Ascaris* nas amostras de lodo de esgoto.

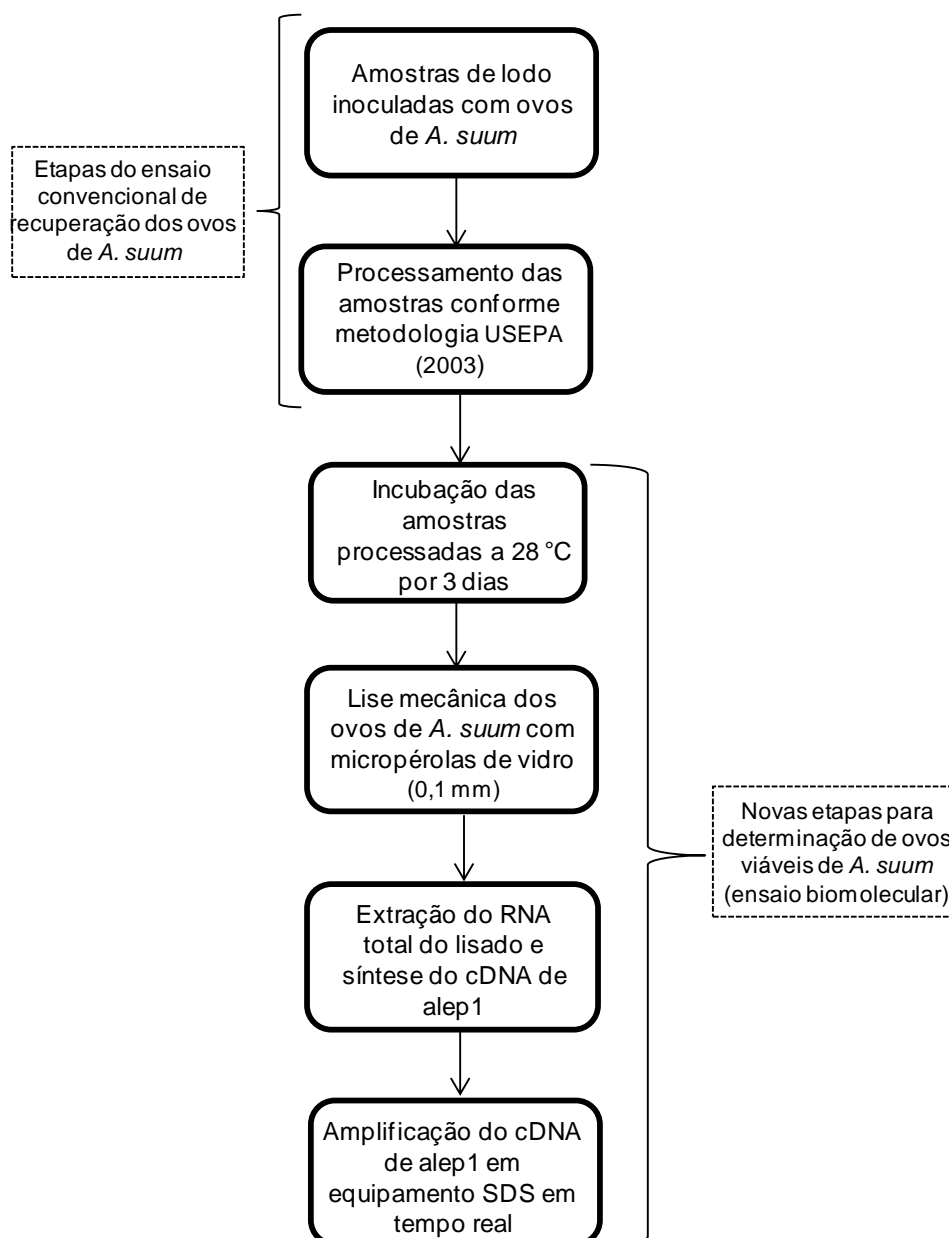


FIGURA 3.6 – DIAGRAMA DO ENSAIO BIOMOLECULAR PARA DETERMINAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE *Ascaris*

Nota: As duas primeiras etapas seguem a mesma metodologia do ensaio convencional de recuperação dos ovos inoculados

FONTE: O autor (2014)

### 3.3 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS REALIZADOS

Como último objetivo específico da pesquisa, os resultados obtidos na determinação de ovos viáveis de *Ascaris* em lodo por microscopia óptica (metodologia USEPA, 2003) foram avaliados utilizando-se ferramentas estatísticas de análise, a saber:

- i. teste de Kruskal-Wallis para análise da variância na recuperação dos ovos inoculados, entre os diferentes tratamentos utilizados (lodos AN, AC, BN e BC, três concentrações de inóculos e três campanhas). Neste teste a hipótese nula ( $H_0$ ) afirmava não haver diferença na recuperação dos ovos de acordo com o tipo de lodo inoculado/ concentração/ campanha, e a hipótese alternativa ( $H_1$ ) afirmava que a recuperação dos ovos era dependente da característica avaliada;
- ii. teste U de Mann-Whitney, após confirmação da existência de diferença significativa nos testes de Kruskal-Wallis. O teste U verifica a existência de diferença significativa na recuperação de ovos entre cada um dos grupos ensaiados, avaliados par a par.

O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado aos dados agrupados dos quatro tipos de lodo (AN, AC, BN e BC), com tamanho de amostra  $N=27$  (triplicatas de três concentrações de inóculos e três campanhas de coletas), com exceção do lodo AN, cujo tamanho da amostra foi  $N = 18$ , devido à realização de apenas duas coletas para este tipo de lodo (Seção 4.1.1).

As concentrações de inóculo também foram avaliadas pelo Teste de Kruskal-Wallis, ensaiando cada lodo separadamente. Nestes casos  $N=9$  (triplicatas de cada concentração e três campanhas realizadas), com  $N= 6$  para o lodo AN. Por último, o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado na avaliação da influência das diferentes campanhas na acurácia determinada para cada lodo, mantendo o tamanho das amostras em  $N= 9$  (lodos AC, BN e BC) e  $N=6$  (lodo AN).

É importante salientar que nesta etapa optou-se pela realização de testes estatísticos não paramétricos, também denominados de testes livres de distribuição, visando a um tratamento estatístico mais robusto, principalmente dado o tamanho das amostras. Os testes foram aplicados utilizando-se o *software* SPSS<sup>®</sup>, versão 13.0 (SPSS INC., 2004), com um intervalo de confiança de 95%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o desenvolvimento desta pesquisa. De forma similar à organização do Capítulo 3 – Material e Métodos, os resultados encontram-se divididos de acordo com cada objetivo específico proposto; a exceção está relacionada às análises estatísticas, cujos resultados são apresentados e discutidos ao longo do Capítulo.

### 4.1 AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DA METODOLOGIA USEPA (2003) PARA DETERMINAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE *Ascaris* EM LODO DE ESGOTO

Esta pesquisa teve como primeiro objetivo específico a avaliação da recuperação de ovos de *Ascaris* inoculados em amostras de lodo de esgoto, utilizando-se a metodologia especificada pela USEPA (2003). A importância desta avaliação reside não somente na verificação da acurácia e precisão de um ensaio de quantificação; mais do que isto, o questionamento se encontra na validade desta metodologia, quando aplicada de forma idêntica a amostras com características e matrizes tão diversas, como é o caso do lodo de esgoto. Os resultados dos ensaios realizados visando ao cumprimento deste primeiro objetivo são apresentados e discutidos nas próximas seções.

#### 4.1.1 Concentração de sólidos nas amostras de lodo

A determinação da concentração de sólidos totais nas amostras de lodo é etapa essencial para a definição dos ensaios de recuperação dos ovos de *A. suum*. Isto porque, de acordo com as Normas Regulatórias (USEPA, 2003; CONAMA, 2006), a quantidade de ovos de *Ascaris* em uma amostra de lodo deve ser expressa como número de ovos viáveis por grama de sólidos totais. A Tabela 4.1 apresenta os resultados de sólidos, totais, fixos e voláteis, obtidos para as amostras de lodo, considerando-se as três campanhas de coletas realizadas. É importante salientar que durante a terceira campanha de coleta não foi possível coletar amostras de lodo anaeróbio da saída da centrífuga, que se encontrava inoperante no período. Desta forma, nesta campanha foram coletas apenas amostras de lodo anaeróbio caleado (AC3), disposto no pátio de estocagem da ETE Atuba Sul.

A concentração de sólidos totais encontrada para lodo aeróbio foi menor do

que aquela observada para lodos anaeróbios (Tabela 4.1). Esta concentração está vinculada ao processo de tratamento de esgotos no qual se originam os lodos. Sistemas anaeróbios tipo UASB geram lodos com teor aproximado de sólidos secos entre 3% a 6%. Por sua vez, considerando-se o sistema aeróbio de lodos ativados com aeração prolongada, este valor encontra-se entre 0,8% e 1,2%. Um fator determinante da eficiência da centrífuga no processo de desaguamento é a concentração de sólidos voláteis no lodo. Desta forma, quanto maior o grau de estabilização do lodo a ser desaguado, melhor será o desempenho observado na centrífuga e, por conseguinte, o teor de sólidos na torta gerada (ANDREOLI *et al.*, 2001).

TABELA 4.1 – CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS (ST), FIXOS (SFT) E VOLÁTEIS (SVT) NAS AMOSTRAS DE LODO COLETADAS

		ST <sup>1</sup>	SFT <sup>1</sup>	SVT <sup>1</sup>
<b>AN</b>	1	18,92 ± 0,04	9,58 ± 0,10	9,34 ± 0,13
	2	19,48 ± 0,25	10,5 ± 0,26	8,98 ± 0,07
	3 <sup>+</sup>	ND	ND	ND
<b>AC</b>	1	19,25 ± 0,82	11,81 ± 0,45	7,44 ± 0,45
	2	24,59 ± 0,38	16,33 ± 0,22	8,26 ± 0,15
	3 <sup>++</sup>	36,43 ± 0,66	24,45 ± 0,66	11,98 ± 0,10
<b>BN</b>	1	13,70 ± 0,65	5,23 ± 0,15	8,47 ± 0,50
	2	14,24 ± 0,6	4,33 ± 0,11	9,91 ± 0,49
	3	17,43 ± 0,22	5,88 ± 0,15	11,55 ± 0,09
<b>BC</b>	1	23,48 ± 0,43	15,60 ± 1,11	7,87 ± 1,52
	2	24,87 ± 0,72	16,06 ± 2,28	8,81 ± 1,61
	3	18,47 ± 0,82	11,84 ± 0,44	6,63 ± 1,26

FONTE: O autor (2014)

Notas: <sup>1</sup>valores em % de sólidos; ± desvio-padrão; <sup>+</sup> coleta não realizada devido à inatividade da centrífuga da ETE Atuba no período; <sup>++</sup> lodo coletado em pátio de estocagem; ND - não determinado; AN – lodo anaeróbio centrifugado e não caleado; AC – lodo anaeróbio centrifugado e caleado; BN – lodo aeróbio centrifugado e não caleado; BC – lodo aeróbio centrifugado e caleado



Lodos caleados apresentaram concentração de sólidos acima daquela encontrada para lodos não caleados, expressa pelo aumento no teor de sólidos fixos das amostras (BITTENCOURT *et al.*, 2011). Conforme apresentado anteriormente, as amostras de lodo caleado coletadas na 3ª campanha na ETE Atuba (AC3) foram originárias do pátio de estocagem da ETE. Assim, as concentrações de sólidos nestas amostras são expressivamente maiores do que aquelas observadas para lodos caleados imediatamente após a centrifugação. Os valores de sólidos totais (ST) encontrados foram utilizados para o cálculo da quantidade de ovos adicionada nas amostras, visando atingir as concentrações utilizadas nos ensaios de recuperação (Seção 3.1.3).

#### 4.1.2 Avaliação da viabilidade dos ovos de *Ascaris suum*

Os ovos de *A. suum* adquiridos da empresa Excelsior Sentinel (Ithaca, NY) foram fornecidos em estágio embrionário, ou seja, contendo apenas uma célula germinativa. Neste estágio não é possível diferenciar ovos de *A. suum* viáveis, daqueles inviáveis, isto é, sem potencial para originar uma larva. Na Figura 4.1 são apresentadas fotomicrografias ópticas dos ovos de *A. suum* presentes na suspensão padrão adquirida. Tanto ovos com a membrana mamilonada característica (4.1-a), como ovos decorticados (4.1-b) foram encontrados durante análise microscópica da suspensão.

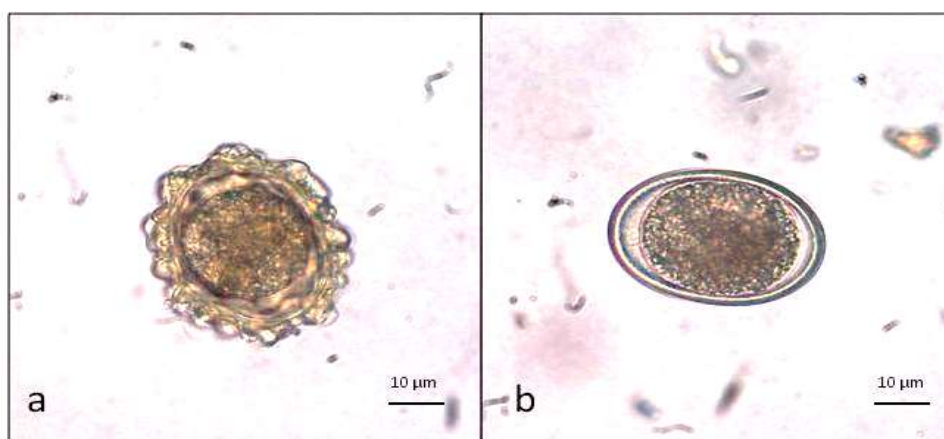


FIGURA 4.1 – OVOS DE *A. suum* EM SOLUÇÃO DE FORMALINA 0,5% a) OVO COM MEMBRANA MAMILONADA; b) OVO DECORTICADO

FONTE: O autor (2013)

Apenas ovos viáveis de *A. suum* apresentarão transcrição do DNA, ou seja, síntese de RNA nas células. Assim, é necessário conhecer a concentração de ovos

viáveis na suspensão fornecida, pois esta será utilizada no desenvolvimento de método biomolecular de determinação de ovos de *Ascaris*.

Durante a análise em microscopia óptica, após a incubação, ovos contendo a larva, ou em estágio de desenvolvimento embrionário com mais de uma célula, foram considerados viáveis. Os ovos que não sofreram divisão celular e continuaram com apenas uma célula foram considerados inviáveis. Na Figura 4.2- a e b são apresentadas, respectivamente, fotomicrografias ópticas de um ovo inviável e de um ovo viável (larvado), visualizados nas amostras analisadas.

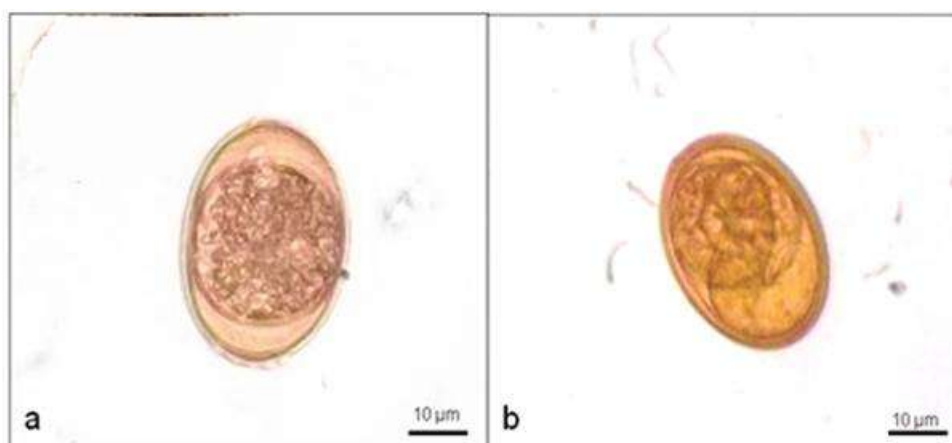


FIGURA 4.2 – OVOS DE *A. suum* APÓS INCUBAÇÃO A 28°C, POR 21 DIAS: a) OVO INVIÁVEL; b) OVO VIÁVEL (LARVADO)

FONTE: O autor (2013)

A porcentagem média de ovos viáveis de *A. suum* foi 81%, considerando-se as três diluições avaliadas. Na Tabela 4.2 são apresentadas as quantidades de ovos viáveis e inviáveis encontradas nas diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  da suspensão padrão e a respectiva porcentagem de viabilidade para cada uma destas amostras. Como é esperado que a incerteza dos resultados aumente com a realização de diluições das amostras, a viabilidade real deve estar próxima ao valor da menor diluição, isto é, 86%. Este valor é condizente com aquele fornecido pela empresa fornecedora dos ovos, que é igual a 90%. As diluições  $10^{-1}$ , por apresentarem concentração elevada de ovos de *A. suum*, não foram consideradas nos ensaios de viabilidade, devido à dificuldade na contagem microscópica dos ovos presentes nestas amostras.

TABELA 4.2 – NÚMERO DE OVOS TOTAIS, VIÁVEIS E INVIÁVEIS DE *A. suum* EM DIFERENTES DILUIÇÕES DA SUSPENSÃO PADRÃO

Diluição	N	Ovos totais (mL <sup>-1</sup> )	Viáveis (mL <sup>-1</sup> )	Inviáveis (mL <sup>-1</sup> )	Viabilidade (%)
10 <sup>-2</sup>	6	558 ± 10	480 ± 10	78 ± 4	86 ± 1,8
10 <sup>-3</sup>	6	43 ± 3	32 ± 3	11 ± 2	74,4 ± 7
10 <sup>-4</sup>	6	6 ± 2	5 ± 1	1	83,3 ± 16,7

Nota: N- número de amostras incubadas; ± desvio padrão

FONTE: O autor (2013)

#### 4.1.3 Avaliação da metodologia USEPA (2003) na recuperação de ovos viáveis de *Ascaris* em lodo de esgoto

Ensaio de recuperação (*split/ spike*) são especificados pelas normas reguladoras, entre elas a USEPA (2003) e a NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005), para verificação da acurácia de um método, quando em um processo de validação.

Os ensaios de recuperação são de fácil execução e podem ser aplicados em diversas áreas que apresentem interesse na verificação e validação de um ensaio analítico. Entretanto, é fundamental que o organismo, ou molécula, alvo seja acessível e fornecido em quantidade e pureza conhecidas. Neste estudo, uma das principais dificuldades observadas durante a realização dos ensaios de recuperação foi a aquisição de ovos purificados de *Ascaris suum*. Este material, na forma concentrada e purificada, não é comercializado no Brasil, sendo necessária a importação a partir de empresas especializadas como a norte-americana Excelsior Sentinel. Entretanto, esta aquisição tem um custo elevado, principalmente devido a onerosas taxas de importação. Além disto, a aquisição de material biológico de outros países exige a autorização por parte de agências de controle e vigilância sanitária, o que torna o processo lento, colocando em risco o desenvolvimento da pesquisa.

Conhecendo esta realidade, um questionamento que surge refere-se à exigência na metodologia USEPA (2003) para o uso de ovos de *A. suum* como controles durante o processo de incubação das amostras (ver Anexo A). Estes controles são importantes para a definição do período adequado para a leitura das amostras; quando a maior parte dos ovos do controle se encontrarem embrionados as amostras estarão prontas para a leitura. Entretanto, tendo em

vista a dificuldade na aquisição deste material, é provável que muitos laboratórios de análise parasitológica não adotem esta exigência, apesar de sua importância para a correta execução da metodologia. Uma solução para estas dificuldades seria a coleta, purificação e concentração de ovos de *A. suum* presentes em resíduos de abatedouros de suínos no Brasil. Apesar de ser um processo bastante trabalhoso e insalubre, grande quantidade de ovos pode ser isolada desta forma, o que poderia garantir uma reserva adequada de material para ser utilizada como controle nos ensaios de quantificação ou em processo de validação.

Após a aquisição do material biológico, foi possível realizar os ensaios de recuperação e avaliar a resposta da metodologia USEPA (2003). Na Tabela 4.3 são apresentados os valores de acurácia (% de recuperação) e viabilidade (%) obtidos para as amostras de lodo, considerando-se as três campanhas de coletas realizadas. A porcentagem de recuperação, ou acurácia, e a porcentagem de viabilidade foram calculadas aplicando-se as Equações 3.1 e 3.2, respectivamente (Seção 3.1.3).

Analisando os resultados apresentados na Tabela 4.3, é possível elencar algumas observações importantes:

- de forma geral, considerando-se a acurácia do método para as três coletas realizadas, tanto lodos anaeróbios quanto aeróbios apresentaram valores abaixo do especificado pelo método da USEPA (2003), que é de 75%, considerando-se lodos digeridos anaerobicamente. O método da USEPA não apresenta valores de acurácia determinados para lodos aeróbios (BOWMAN *et al.*, 2003);
- lodos anaeróbios apresentaram a maior recuperação de ovos, com um valor máximo de 59,8%, obtido nas amostras AN1 contendo a menor concentração de inóculo. Em relação ao lodo anaeróbio caleado, o valor de acurácia obtido foi próximo ao observado nas amostras não caleadas; a viabilidade observada, entretanto, foi consideravelmente reduzida na presença de cal. Redução ainda mais significativa foi observada em lodo AC3, coletado em pátio de estocagem, indicando que o tempo de maturação do lodo após a caleação é importante para aumentar sua resistência a patógenos;
- lodos aeróbios apresentaram acurácia bastante baixa, com um valor máximo de 25% para amostras BC3, contendo 0,25 ovo/ g ST. A menor

porcentagem de recuperação observada entre as amostras aeróbias foi de 3,5% para lodo BN1 inoculado com 1 ovo/ g ST. A redução da viabilidade dos ovos nas amostras caleadas de lodos aeróbios foi ainda mais notável do que o observado em lodo anaeróbio, atingindo 25% em amostras BC3 com inóculo de 1 ovo/ g ST.

- quanto menor a quantidade de ovos nas amostras, maior a dispersão estatística observada, indicando que as medidas realizadas nestes casos são menos consistentes, dado o tamanho da amostra.

Os resultados, aquém do esperado pela metodologia, evidenciam a falta de dados sobre a aplicabilidade do método para amostras de lodo de origem e composição diversas. Bowman e colaboradores (2003), ao definirem a acurácia da metodologia adotada pela USEPA, avaliaram quatro matrizes de biossólidos, a saber: i) lodo tratado pelo processo *Synox* (SOBSEY *et al.*, 1990), em que há adição de ácido sulfúrico, ozônio e ácido nítrico (tratamento ácido); ii) lodo digerido anaerobicamente e armazenado em lagoa; iii) mistura contendo solo e lodo anaeróbio estabilizado; e iv) lodo após tratamento alcalino Chemfix (adição de cal, cimento Portland e sílica) (REIMERS *et al.*, 1990).

Entretanto, a Norma USEPA generaliza a aplicação destes ensaios para amostras de esgoto, lodos e compostos (Apêndice I EPA/625/R-92/013 – ver Anexo A), sem especificar para quais tipos de lodos a acurácia da metodologia pode ser adequada. Desta forma, dada a ausência de ensaios para matrizes de lodo variadas, a especificação pelo CONAMA (2006) de que a metodologia definida pela USEPA (2003) seja utilizada para quantificação de ovos de *Ascaris* em lodos gerados nos processos de tratamento no Brasil é questionável.

A não universalidade do método USEPA de quantificação de ovos de *Ascaris* em lodo pode ser evidenciada pela análise estatística dos dados de acurácia obtidos neste estudo. Aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis aos lodos AN, AC, BN e BC, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com  $p < 0,05$ ; o resultado, entretanto, não indica entre quais grupos essa diferença ocorre, sendo necessária a confirmação pelo teste U de Mann-Whitney.

TABELA 4.3 – ACURÁCIA (% DE RECUPERAÇÃO) E VIABILIDADE (%) NA QUANTIFICAÇÃO DE OVOS DE *A. SUUM* PELA METODOLOGIA USEPA (2003)

Tipo de lodo	Amostra	Inóculo (ovos / g)	Acurácia (%)			Viabilidade (%)		
			1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Anaeróbio	AN	10	45,3 ± 1,5	29,8 ± 6,1		97,1 ± 0,6	83 ± 3,6	
		1	42,7 ± 6,1	21 ± 4,2	NR	93,8 ± 1,9	80,6 ± 3,9	NR
		0,25	59,8 ± 6,2	35 ± 7,1		93,5 ± 6,3	58,3 ± 11,8	
	AC	10	32,6 ± 2,1	23,3 ± 1,3	40,3 ± 3,1	81,6 ± 0,5	66,6 ± 18,3	32,4 ± 2,3
		1	41,3 ± 6,1	48,7 ± 4,2	56,3 ± 1,5	69,3 ± 3,8	62,2 ± 9,6	57,1 ± 5,1
		0,25	58,3 ± 8,3	30 ± 14,1	41,3 ± 2,1	51,8 ± 9,9	50 ± 2,1	40 ± 1,6
Aeróbio	BN	10	4,7 ± 2,1	7,5 ± 2,3	13,3 ± 3,5	75,8 ± 9,5	80 ± 8,6	30,7 ± 5,4
		1	3,5 ± 1,5	18 ± 2,5	19 ± 2,1	73,6 ± 12,9	77,8 ± 8,7	50 ± 8,9
		0,25	16,7 ± 8,4	20 ± 9,4	16,4 ± 4,4	72,2 ± 25,45	50 ± 22,9	50 ± 12,9
	BC	10	7,3 ± 1,1	12 ± 1,2	5,3 ± 1,5	59,6 ± 5,9	54,2 ± 6,8	40 ± 6,2
		1	4,7 ± 1,2	14 ± 3,2	8 ± 2,7	55,6 ± 9,6	85,7 ± 12,8	25 ± 8,2
		0,25	11,1 ± 4,8	16,7 ± 5,8	25 ± 5,2	33,3 ± 28,87	66,7 ± 28,9	33,3 ± 18,9

Notas: AN – lodo anaeróbio centrifugado não caleado; AC – lodo anaeróbio centrifugado caleado; BN – lodo aeróbio centrifugado não caleado; BC – lodo aeróbio centrifugado caleado. NR – Coleta não realizada devido à inatividade da centrífuga da ETE Atuba no período

FONTE: O autor (2014)

Comparando os resultados dos *ranks* médios obtidos no teste de Kruskal-Wallis é possível afirmar que a maior recuperação dos ovos de *Ascaris* vai ocorrer no lodo anaeróbio (Figura 4.3). Entre os lodos anaeróbios, o lodo caleado (AC) apresentou um *rank* ligeiramente superior àquele do não caleado (AN), indicando maior acurácia nas análises de recuperação realizadas com este tipo de lodo. Entretanto, a diferença entre os *ranks* é baixa e pode ter sido influenciada pela diferença de tamanho entre as amostras. Para verificar se há diferença significativa entre os lodos anaeróbios AN e AC aplicou-se o teste U de Mann-Whitney. O resultado do teste pode ser visualizado na Figura 4.4 e indica a inexistência de diferença significativa na acurácia dos ensaios de recuperação entre lodo anaeróbio não caleado (AN) e caleado (AC), com valor  $p = 0,676$  (Figura 4.4-a).

Ranks			
	Tipo de lodo	N	Mean Rank
Acurácia (% de recuperação)	1	18	75,50
	2	27	77,33
	3	27	30,00
	4	27	25,67
	Total	99	

Test Statistics <sup>a,b</sup>	
	Acurácia (% de recuperação)
Chi-Square	71,201
df	3
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test  
b. Grouping Variable: Tipo de lodo

FIGURA 4.3 – RESULTADOS DO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS DE ANÁLISE DE DIFERENÇA ENTRE GRUPOS, APLICADO AOS DIFERENTES TIPOS DE LODO

Notas: Tipo de lodo: 1- AN, 2- AC, 3- BN, 4- BC; Asymp. Sig fornece o valor-p ( $<0,05$ )

FONTE: O autor (2014)

De forma similar, pôde-se verificar a existência ou não de diferença entre lodos aeróbios caleados e não caleados aplicando-se o teste U. Assim como os lodos anaeróbios, os resultados obtidos indicaram não haver diferença significativa

entre as amostras BN e BC, com um valor-p igual a 0,242 (Figura 4.4-b). Alterar a variável dependente para viabilidade de ovos, entretanto, confirma a diferença significativa entre lodos caleados, anaeróbios ou aeróbios ( $p < 0,05$  para ambos os pares). Esta resposta confirma o que se esperava em relação ao processo de caleação, isto é, que a elevação do pH do lodo ocasiona a inativação gradativa dos ovos de *Ascaris* presentes, conforme apresentado por diversos autores (ERICKSEN *et al.*, 1996; BREWSTER *et al.*, 2003; CAPIZZI-BANAS *et al.*, 2004).

Com base no exposto, é possível afirmar que a caleação não interfere na recuperação dos ovos do parasita *Ascaris* e sim na porcentagem de viabilidade destes ovos. Desta forma, a diferença de recuperação dos ovos entre os grupos, indicada pelo teste de Kruskal-Wallis, refere-se a lodos anaeróbios e aeróbios.

A diferença na composição e propriedades de lodos de esgoto anaeróbios e aeróbios é bem documentada na literatura (SOMMERS, 1977; HERNÁNDEZ *et al.*, 1991; ZIPPER *et al.*, 1999; SHENG e YU, 2006; BANEGAS *et al.*, 2007). Deve-se esperar, portanto, que uma metodologia de recuperação de material biológico, que dependa de propriedades como sedimentabilidade e teor de sólidos, apresente diferenças de resposta, utilizando matrizes tão diversas em seus ensaios. Entretanto, a Resolução CONAMA Nº 375/ 06 não leva em consideração as diferentes características existentes nos lodos gerados no Brasil, o que pode colocar em risco a saúde pública e ambiental, caso sejam especificados ensaios de diagnóstico de patógenos não adequados à realidade do país.

a Test Statistics <sup>a</sup>		b Test Statistics <sup>a</sup>	
	Acurácia (% de recuperação)		Acurácia (% de recuperação)
Mann-Whitney U	225,000	Mann-Whitney U	297,000
Wilcoxon W	396,000	Wilcoxon W	675,000
Z	-,418	Z	-1,171
Asymp. Sig. (2-tailed)	,676	Asymp. Sig. (2-tailed)	,242

a. Grouping Variable: Lodos anaeróbios

a. Grouping Variable: Lodos aeróbios

FIGURA 4.4 – RESULTADOS DO TESTE U DE MANN-WHITNEY DE ANÁLISE DE DIFERENÇA ENTRE DUAS AMOSTRAS: a) LODOS ANAERÓBIOS AN E AC; b) LODOS AERÓBIOS BN E BC

Notas: Asymp. Sig. (2-tailed) fornece o valor-p

FONTE: O autor (2014)



O teste de Kruskal-Wallis também foi aplicado visando à análise da diferença na recuperação dos ovos de *Ascaris* considerando-se grupos de concentração e de campanha de coletas.

Com exceção do lodo AN, os demais grupos apresentaram diferença significativa na recuperação dos ovos de *A. suum*, considerando-se as diferentes concentrações de inóculo. O valor-p foi igual a 0,143 para o lodo AN; e 0,03, 0,05 e 0,01 para as amostras AC, BN e BC, respectivamente (Figura 4.5 a-d). As amostras AN, durante seu processamento pela metodologia USEPA, apresentaram boa sedimentabilidade e homogeneidade, o que pode ter evitado a formação de aglomerados de ovos, comuns em concentrações elevadas deste parasita (Seção 4.1.3.1, Figura 4.9). Assim, no caso de amostras AN, a distribuição do inóculo de forma mais homogênea pode ter sido fator determinante para a ausência de diferença significativa nas concentrações dentro do grupo. Para as demais matrizes de lodo, entretanto, a baixa sedimentabilidade e as perdas de ovos durante o processamento (Seção 4.1.3.1) podem ter se refletido na diferença de recuperação observada, variando conforme a quantidade de inóculo utilizada.

<p><b>a</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Test Statistics<sup>a,b</sup></th> </tr> <tr> <th></th> <th>Acurácia (% recuperação)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chi-Square</td> <td>3,886</td> </tr> <tr> <td>df</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig.</td> <td>,143</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Kruskal Wallis Test b. Grouping Variable: Concentração</p>	Test Statistics <sup>a,b</sup>			Acurácia (% recuperação)	Chi-Square	3,886	df	2	Asymp. Sig.	,143	<p><b>b</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Test Statistics<sup>a,b</sup></th> </tr> <tr> <th></th> <th>Acurácia (% recuperação)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chi-Square</td> <td>11,871</td> </tr> <tr> <td>df</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig.</td> <td>,003</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Kruskal Wallis Test b. Grouping Variable: Concentração</p>	Test Statistics <sup>a,b</sup>			Acurácia (% recuperação)	Chi-Square	11,871	df	2	Asymp. Sig.	,003
Test Statistics <sup>a,b</sup>																					
	Acurácia (% recuperação)																				
Chi-Square	3,886																				
df	2																				
Asymp. Sig.	,143																				
Test Statistics <sup>a,b</sup>																					
	Acurácia (% recuperação)																				
Chi-Square	11,871																				
df	2																				
Asymp. Sig.	,003																				
<p><b>c</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Test Statistics<sup>a,b</sup></th> </tr> <tr> <th></th> <th>Acurácia (% recuperação)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chi-Square</td> <td>10,689</td> </tr> <tr> <td>df</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig.</td> <td>,005</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Kruskal Wallis Test b. Grouping Variable: Concentração</p>	Test Statistics <sup>a,b</sup>			Acurácia (% recuperação)	Chi-Square	10,689	df	2	Asymp. Sig.	,005	<p><b>d</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Test Statistics<sup>a,b</sup></th> </tr> <tr> <th></th> <th>Acurácia (% recuperação)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chi-Square</td> <td>8,956</td> </tr> <tr> <td>df</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Asymp. Sig.</td> <td>,011</td> </tr> </tbody> </table> <p>a. Kruskal Wallis Test b. Grouping Variable: Concentração</p>	Test Statistics <sup>a,b</sup>			Acurácia (% recuperação)	Chi-Square	8,956	df	2	Asymp. Sig.	,011
Test Statistics <sup>a,b</sup>																					
	Acurácia (% recuperação)																				
Chi-Square	10,689																				
df	2																				
Asymp. Sig.	,005																				
Test Statistics <sup>a,b</sup>																					
	Acurácia (% recuperação)																				
Chi-Square	8,956																				
df	2																				
Asymp. Sig.	,011																				

FIGURA 4.5 – RESULTADOS DO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS DE ANÁLISE DE DIFERENÇA ENTRE GRUPOS, APLICADO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO : a) AN, b) AC, c) BN, d) BC

Notas: Asymp. Sig. (2-tailed) fornece o valor-p

FONTE: O autor (2014)

Para as diferentes campanhas de coleta, o teste Kruskal-Wallis aplicado afirmou haver diferença significativa para os lodos AN, BN e BC. De acordo com o teste, a amostra AC não apresentou diferença significativa, mas o valor-p encontrado (0,065) foi bastante próximo do nível de significância  $\alpha$  estabelecido (0,05). A diferença encontrada, neste caso, pode estar mais associada à robustez de resposta fornecida pela aplicação do teste não paramétrico, do que a real ausência de diferença significativa entre as coletas para este tipo de lodo. Uma forma de confirmar, ou refutar, esta resposta seria o aumento do tamanho da amostra N, em ensaios subsequentes.

As diferenças significativas de recuperação dos ovos, encontradas para lodos AN, BN e BC considerando-se as campanhas de coleta (valor-p igual a 0,001, 0,018 e 0,006, respectivamente) devem estar associadas, muito provavelmente, a variações temporais na qualidade dos lodos coletados. De fato, é sabido que as propriedades do lodo podem variar local e temporalmente, devido às flutuações sazonais e variações nas características do esgoto tratado (BANEGAS *et al.*, 2007; SALMIATI *et al.*, 2012). Além disto, não se pode desconsiderar o fator operacional, que exerce uma forte influência na característica dos lodos gerados; a inatividade ou mau funcionamento de algum equipamento dentro do fluxograma de uma ETE compromete em grande extensão a qualidade do lodo gerado.

Além do problema da falta de universalidade, evidenciado pela diferença significativa na recuperação de ovos de *Ascaris* para lodos anaeróbios e aeróbios, e entre diferentes concentrações e períodos de coleta, o método USEPA (2003) apresentou baixa acurácia de forma geral para as amostras avaliadas neste estudo. A seção a seguir apresenta as dificuldades encontradas na implementação da metodologia avaliada, assim como prováveis causas para a baixa acurácia observada nas amostras ensaiadas.

#### 4.1.3.1 Avaliação das perdas durante processamento das amostras e quantificação de ovos viáveis de *A. suum* pela metodologia USEPA (2003)

A metodologia de quantificação especificada pela USEPA utiliza diversas sequências de lavagem da amostra com detergente 7X (MB Biomedicals), visando

à dessorção dos ovos das partículas de lodo, reduzindo a quantidade de interferentes à análise. A primeira dificuldade para a implantação do método é a aquisição deste reagente; material que encarece os procedimentos.

As várias lavagens com detergente não levam à perda significativa dos sólidos sedimentados, que devem conter os ovos de *A. suum* inoculados. Entretanto, a etapa de sucção a vácuo, utilizada para a remoção do sobrenadante após a sedimentação das amostras em contato com o detergente, pode remover parte dos sólidos de fundo, se não for realizada com cautela. Uma recomendação válida é manter uma fina camada de líquido imediatamente sobre a superfície dos sólidos, o que pode evitar a perda de material.

Após as sequências de lavagem, sedimentação, filtração e peneiramento em abertura de 50 mesh, esta última para remover os sólidos grosseiros, a etapa de flotação era realizada. Nesta etapa, os ovos de *Ascaris suum*, com densidade de 1,18, flutam em solução de sulfato de magnésio ( $d= 1,20$ ), após centrifugação. Entretanto, conforme observado, é importante que a quantidade de sólidos utilizada não exceda a marca de 1 mL para tubos tipo Falcon de 15 mL, e 5 mL no caso de tubos de 50 mL. O excesso de sólidos no fundo dos tubos interfere na flotação, levando à suspensão de partículas de lodo, conforme apresentado na Figura 4.6-a. Ao serem transportadas juntamente com o sobrenadante, essas partículas serão retidas com os ovos na segunda etapa de peneiramento, em abertura de 400 mesh (Figura 4.6-b). Portanto, esta etapa pode interferir na visualização em microscopia ótica, ao carrear contaminantes que podem mascarar a presença dos ovos no campo microscópico analisado. Alguns interferentes à visualização em microscopia são apresentados na Figura 4.7.

A análise em microscopia ótica exige acuidade visual do analista, pois é grande a presença de interferentes à leitura, como restos celulares e outras células como leveduras e grãos de pólen (Figura 4.8). Desta forma, quando não realizada por um analista bem treinado, a leitura microscópica pode não ser condizente com a real quantidade de ovos de *Ascaris* nas amostras, sendo um dos principais pontos críticos da metodologia USEPA (2003).

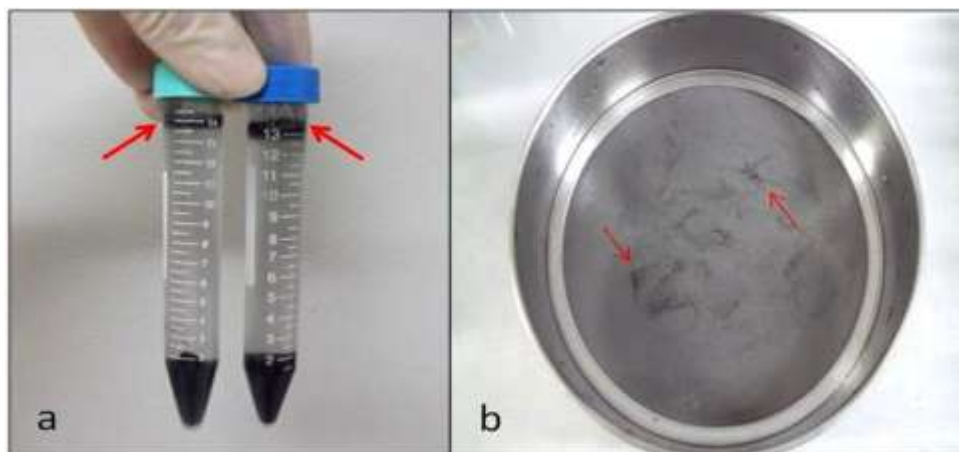


FIGURA 4.6 – PARTÍCULAS DE LODO (SETAS) NÃO REMOVIDAS NAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO: a) FLOTAÇÃO; b) PENEIRAMENTO (400 MESH)

FONTE: O autor (2014)



FIGURA 4.7 – OVO DE *Ascaris suum* (SETA) EM MEIO A PARTÍCULAS INTERFERENTES À VISUALIZAÇÃO EM MICROSCOPIA ÓPTICA

FONTE: O autor (2014)

Em relação à recuperação dos ovos, as amostras contendo as menores concentrações inoculadas (0,25 ovo/ g ST), apresentaram a maior média de recuperação, nos quatro tipos de amostras avaliadas. Uma possível explicação é que, muitas vezes, os ovos de *Ascaris suum* tendem a se aglomerar, tornando difícil a contagem dos ovos, quando presentes em maior número (Figura 4.9). Nestas situações, a acuidade visual do analista é fator determinante para a qualidade dos ensaios.

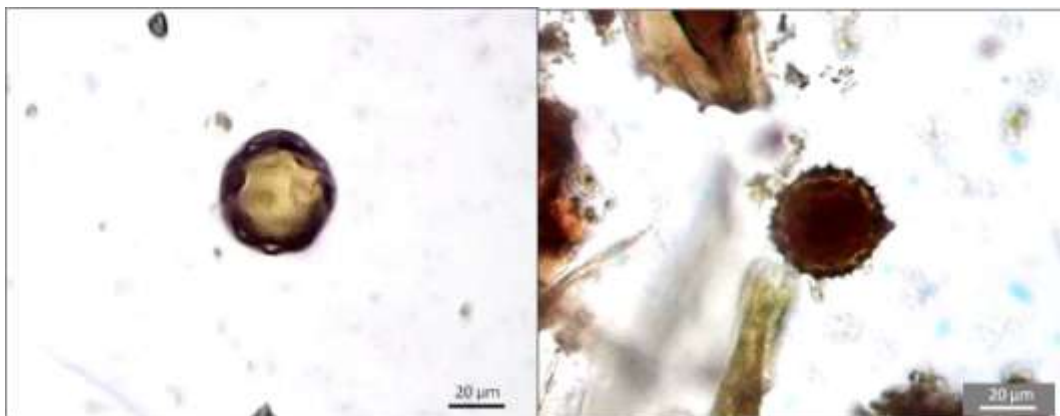


FIGURA 4.8 –ESTRUTURAS SIMILARES A GRÃOS DE PÓLEN, VISUALIZADAS DURANTE A ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS AMOSTRAS

FONTE: O autor (2014)



FIGURA 4.9 –OVOS DE *Ascaris suum* (SETAS) AGRUPADOS EM AMOSTRA AN1, INOCULADA COM 10 OVOS/ g ST

FONTE: O autor (2014)

As amostras ensaiadas apresentaram outros ovos de helmintos isolados juntamente com os ovos de *Ascaris*, entre eles *Trichuris trichiura*, *Taenia* sp., *Hymenolepis diminuta* e ancilostomídeo (Figura 4.10). Entretanto, conforme apresentado anteriormente, a metodologia USEPA aplica-se apenas ao isolamento e purificação de ovos de *Ascaris*, não havendo garantia de que a quantidade encontrada dos ovos destes outros parasitas seja representativa do real número presente nas amostras.



FIGURA 4.10 – OVOS DE OUTROS HELMINTOS OBSERVADOS NAS AMOSTRAS DE LODO ANALISADAS: a) *Trichuris trichiura*; b) *Taenia* sp.; c) *Hymenolepis diminuta*; d) ANCILOSTOMÍDEO

FONTE: O autor (2014)

A baixa acurácia da metodologia USEPA observada para lodos aeróbios pode ser explicada com base nas propriedades do tipo de lodo amostrado. Sistemas de lodos ativados com aeração prolongada baseiam-se nos processos da respiração endógena, em que tecidos celulares biodegradáveis são oxidados a dióxido de carbono, água e amônia, devido à baixa relação alimento/microrganismo (A / M) neste tipo de sistema. Entretanto, durante o processo de respiração endógena pode ocorrer a destruição da estrutura do floco, dificultando a sedimentação dos sólidos neste resíduo (ANDREOLI *et al.*, 2001). Como a metodologia USEPA baseia-se em etapas de sedimentação dos sólidos para recuperação dos ovos nas amostras, caso a sedimentabilidade do lodo não seja adequada, a acurácia da metodologia fica comprometida. Na Figura 4.11 é apresentada uma amostra de lodo BN1, após as etapas de liquidificação e sedimentação a 4 °C, por 4 h.



FIGURA 4.11 –AMOSTRA BN1, APÓS LIQUIDIFICAÇÃO E SEDIMENTAÇÃO A 4°C, POR 4 HORAS.

FONTE: O autor (2014)

A formação de espuma espessa na superfície da amostra, observada na Figura 4.11, indicou a ineficiência no processo de sedimentação, e parte dos sólidos permaneceu em suspensão, prejudicando as etapas subsequentes da metodologia.

Outros agentes interferentes neste tipo de amostra são os microrganismos filamentosos, que quando em excesso na microbiota do lodo, levam à desestruturação do floco, fenômeno denominado *bulking*. Este fenômeno é caracterizado pelo crescimento excessivo de bactérias filamentosas, como os gêneros *Nocardia*, *Microthrix* e *Beggiatoa*, formando uma macroestrutura capaz de interferir na sedimentação e compactação do lodo, devido à produção de flocos com estrutura difusa e pouco condensada (WILLIANS e UNZ, 1985; COSTA *et al.*, 2013). A presença destas filamentosas é favorecida em ambientes com baixa concentração de alimento e nutrientes, como é o caso dos sistemas de lodo ativado com aeração prolongada, devido às suas baixas exigências nutricionais, quando comparadas a outros microrganismos do consórcio da digestão aeróbia (PARSEKIAN e PIRES, 2002).

Na Figura 4.12 são apresentados os sedimentos recuperados das amostras BN1 (4.12-a) e AN1 (4.12-b), após processamento e incubação a 28 °C, por 21 dias, de acordo com a metodologia USEPA. É possível observar que os sedimentos isolados da amostra de lodo aeróbio apresentam uma estrutura difusa, similar a uma rede, o que caracteriza o crescimento de filamentosas. Os sedimentos isolados de amostras de lodo anaeróbio, por sua vez, encontraram-se

mais compactos e sem sólidos em flotação.

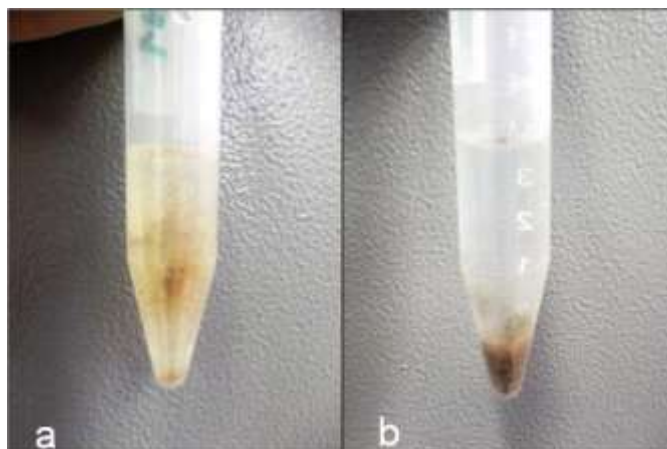


FIGURA 4.12 –SEDIMENTOS APÓS INCUBAÇÃO A 28 °C, POR 21 DIAS: a) AMOSTRA BN1; b) AMOSTRA AN1

FONTE: O autor (2014)

Em análise microscópica das amostras BN1 e BC1, foi possível visualizar a formação do *bulking*, com predominância de bactérias filamentosas similares a *Nocardia* sp. (Figura 4.13). Estes resultados indicam a ineficiência de sedimentação neste tipo de amostra, o que se reflete na baixa acurácia na recuperação de ovos de *Ascaris* observada.



FIGURA 4.13 –MICROORGANISMOS SIMILARES A *Nocardia* sp. EM AMOSTRA BN1

FONTE: O autor (2014)



## 4.2 OTIMIZAÇÃO DE ENSAIO BIOLÓGICO PARA DETERMINAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE *Ascaris* POR RT-qPCR

O segundo objetivo específico da pesquisa refere-se à utilização da técnica de RT-qPCR para determinação de ovos viáveis do parasita *Ascaris* em amostras de lodo de esgoto. Conforme apresentado na Seção 2.9, o desenvolvimento desse ensaio biológico compõe a segunda etapa de um processo de validação.

A determinação de ovos viáveis de *Ascaris* também considerou as características morfológicas, embriogênicas e moleculares do parasita. Desta forma, dados sobre o comportamento e características morfológicas e moleculares de *Ascaris* puderam ser utilizados na elaboração da estratégia mais adequada para a otimização deste método.

### 4.2.1 Morfologia e ultraestrutura dos ovos de *Ascaris suum*: avaliação em microscopia eletrônica

Os ensaios de microscopia eletrônica de varredura e transmissão foram realizados com o objetivo de avaliar a estrutura dos ovos de *A. suum*, sabidamente resistentes a processos de lise celular. Como é necessário aos ensaios moleculares de quantificação que os ovos do parasita sejam lisados, visando recuperar o RNA total presente no interior das células, o conhecimento da morfologia e ultraestrutura destes ovos pode prover informações que auxiliem na elaboração de estratégias adequadas de lise.

As fotomicrografias obtidas em MEV (Figuras 4.14 a-d) apresentam o ovo de *Ascaris suum* como uma estrutura compacta, com casca homogênea, podendo estar revestida por uma membrana irregular, denominada de mamilonada (Figura 4.14-a). Esta membrana é constituída, em grande parte, por mucopolissacarídeos e proteínas (QUILÉS *et al.*, 2006) e é secretada pelo útero da fêmea, não sendo constitutiva da oogênese do parasita. Na Figura 4.14-b é apresentada a junção entre a membrana mamilonada e a membrana mais externa constituinte do ovo, denominada de membrana vitelínica (WHARTON, 1980). Dada sua menor espessura dentre as camadas do ovo (aproximadamente 0,2  $\mu\text{m}$ ), a função desta membrana parece não estar vinculada à proteção mecânica. Outras funções que podem estar associadas a esta estrutura são a retenção da luz ultravioleta (QUILÉS *et al.*, 2006) e o auxílio nos processos dispersivos do ovo no meio ambiente, devido às suas propriedades adesivas (MASSARA *et al.*, 2003).

Ovos decorticados apresentam pouca (Figura 4.14-c) ou nenhuma camada mamilonada (Figura 4.14-d). Neste caso, a camada vitelínica de composição lipoproteica encontra-se diretamente em contato com o meio, o que auxilia em processos de desinfecção que utilizam tratamentos por radiação (CHERNICHARO *et al.*, 2003). Entretanto, a lise do ovo não é facilitada por estes processos, que irão interferir na viabilidade dos ovos, mas não em sua estrutura.

A estrutura compacta da camada vitelínica, que confere resistência estrutural aos ovos, é auxiliada por outras duas membranas, a saber: membrana quitinosa, intermediária e mais espessa dentre as três membranas; e membrana lipídica, contendo aproximadamente 75% de lipídeos em sua constituição. Na Figura 4.15 são apresentadas as quatro membranas em corte, visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão.

Com base nas micrografias obtidas e fundamentando-se em discussões da literatura, é possível realizar algumas inferências a respeito do processo de lise dos ovos de *Ascaris*:

- processos de lise baseados em tratamentos químicos devem utilizar agentes químicos combinados para o ataque à membrana, devido à variedade na composição entre as diferentes camadas constituintes da casca;
- processos de lise por dessecação ou turgescência não devem ser eficientes, devido à presença da camada lipídica interna, que confere resistência à passagem de vapor d'água, devido a sua baixa permeabilidade;
- devido à grande resistência estrutural conferida pelo conjunto de membranas constituintes, mecanismos que facilitem a lise mecânica dos ovos devem apresentar resultados adequados.

De acordo com as considerações acima, as estratégias de lise que foram testadas nos ovos de *A. suum* durante este estudo foram definidas. Os resultados obtidos encontram-se descritos e discutidos na Seção 4.2.3.1.

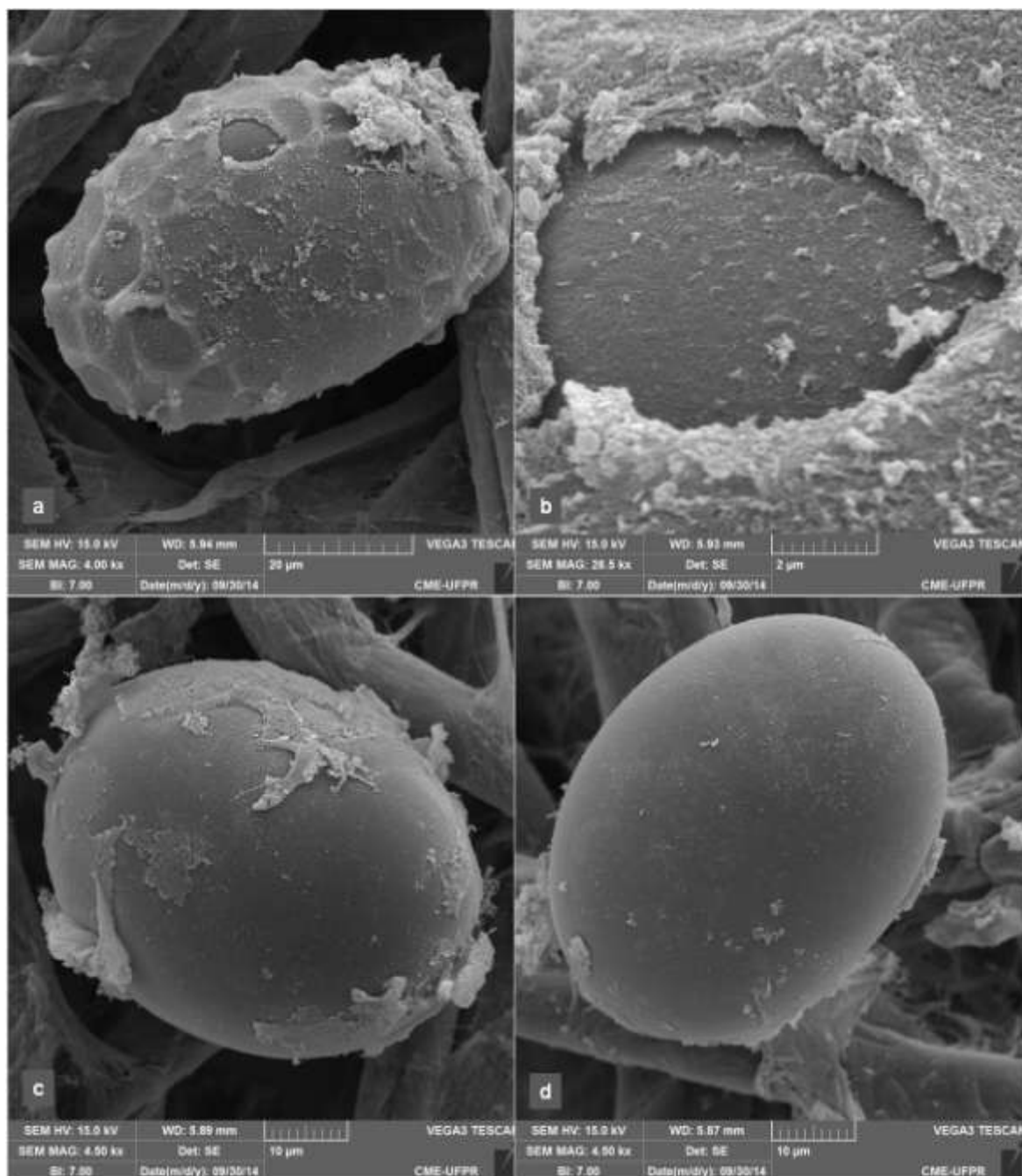


FIGURA 4.14 – MORFOLOGIA DOS OVOS DE *A. suum* EM MEV: a) OVO COM MEMBRANA MAMILONADA; b) DETALHE DA JUNÇÃO ENTRE AS MEMBRANAS MAMILONADA E VITELÍNICA; c) OVO PARCIALMENTE DECORTICADO; d) OVO DECORTICADO

FONTE: O autor (2014)

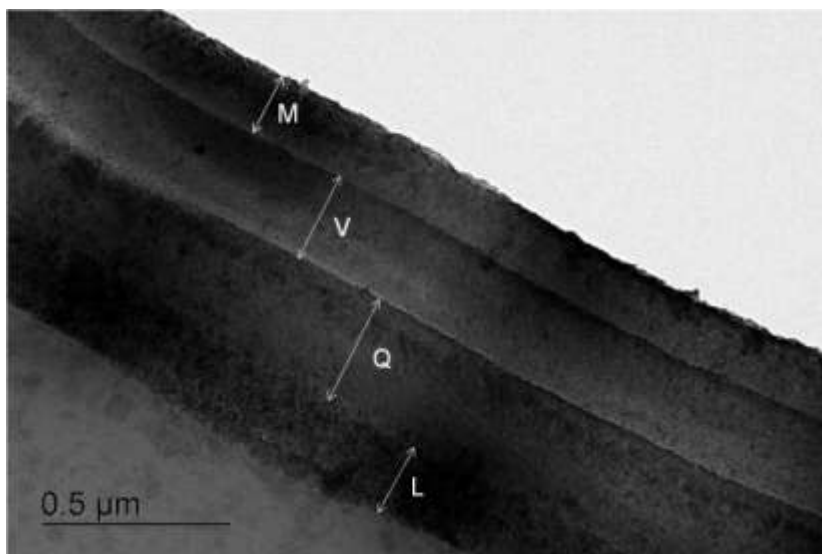


FIGURA 4.15 – ULTRAESTRUTURA DA CASCA DE OVO DE *A. suum* : M - MEMBRANA MAMILONADA; V - MEMBRANA VITELÍNICA; Q- MEMBRANA QUITINOSA; L - MEMBRANA LIPÍDICA

FONTE: O autor (2014)

#### 4.2.2 Desenvolvimento embrionário de *Ascaris suum*

Por se tratar da otimização de uma metodologia que visa identificar o nematódeo *Ascaris* em suas fases iniciais de desenvolvimento, fizeram-se necessários o acompanhamento e a investigação do processo de embriogênese do parasita.

A expressão dos genes em uma espécie está associada à etapa de desenvolvimento em que ela se encontra. Isto porque a atividade celular vai estar relacionada às exigências do meio e às necessidades de cada organismo nas diferentes fases de desenvolvimento. Em *Ascaris*, como nos demais organismos, esta demanda leva ao controle do genoma, que só será transcrito de acordo com a necessidade do indivíduo (ROSA *et al.*, 2014).

Conforme apresentado anteriormente, uma das formas de controle da expressão gênica em *Ascaris* é o fenômeno da redução da cromatina, em que aproximadamente 25% do genoma do parasita são eliminados das células pré-somáticas durante o desenvolvimento embrionário (TOBLER *et al.*, 1972; MORITZ e ROTH, 1976). De acordo com Spicher e colaboradores (1994), esta redução ocorre entre a terceira e a quinta clivagem celular no interior do ovo. Desta forma, o acompanhamento da embriogênese é importante para se definir qual o tempo

ideal, após o início do desenvolvimento embrionário, para que seja realizada a extração do RNA transcrito do gene *alep1* (eliminado das células pré-somáticas do ovo), em quantidade adequada para sua utilização nos ensaios moleculares de determinação do parasita.

Na Figura 4.16 são apresentadas as fases da embriogênese de *Ascaris suum*, observadas em microscopia óptica, durante o período de monitoramento de 21 dias. No início do desenvolvimento de *Ascaris*, circundada pela membrana espessa do ovo, foi observada apenas uma célula, ocupando a maior parte da cavidade interna e caracterizada por um citoplasma denso e granuloso (Figura 4.16-a). Após a primeira divisão, duas células foram perfeitamente distinguíveis, ocupando os dois pólos da estrutura, conforme pode ser visualizado na Figura 4.16-b. A segunda clivagem originou quatro células no interior do ovo (Figura 4.16-c); entretanto, em alguns casos, foi possível observar um estágio intermediário com três células. Este estágio, porém, pareceu ser instável e apenas uma pequena porcentagem dos ovos contendo três células pôde ser observada durante os ensaios.

Após a divisão em quatro células, as clivagens subsequentes deram origem a uma estrutura contendo entre seis e doze células, denominada de mórula inicial (Figura 4.16-d). A mórula (do latim *morula*, ou amora) é a etapa da embriogênese em que as sucessivas divisões dão origem a aglomerados de células, denominados de blastômeros. Esta etapa é dividida em mórula inicial e tardia. Esta última foi identificada nos ensaios a partir do momento em que não era mais possível determinar o número de blastômeros na esfera de células formada (Figura 4.16-e).

Ao final da etapa de mórula tardia, a formação de uma cavidade central, preenchida com líquido, pôde ser visualizada. Esta cavidade é denominada de blastocele e encontra-se revestida internamente por uma camada de células denominada de blastoderme. Sua etapa de formação é conhecida na biologia do desenvolvimento como blástula (Figura 4.16-f). A blastoderme, em processo de diferenciação celular posterior, vai originar os órgãos internos do parasita. Nos dias subsequentes, observou-se a ocorrência de uma invaginação devido à movimentação das células do embrião. Esta etapa é definida na literatura como gastrulação (Figura 4.16-g) e caracteriza-se pela formação dos três folhetos

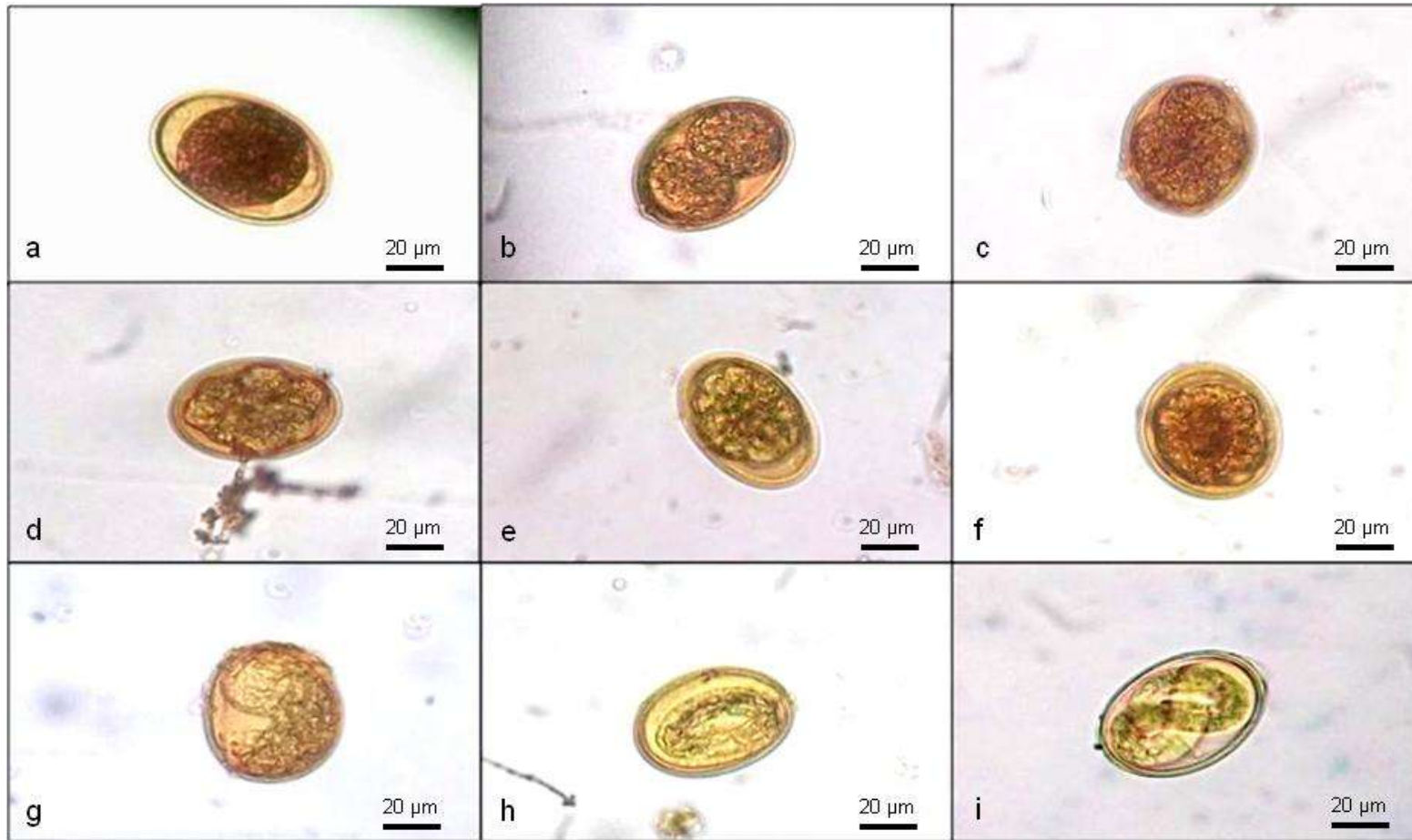


FIGURA 4.16 – ETAPAS DA EMBRIOGÊNESE DE *A. Suum*: a) OVO COM UMA CÉLULA GERMINATIVA; b) DUAS CÉLULAS; c) QUATRO CÉLULAS; d) MÓRULA INICIAL; e) MÓRULA TARDIA; f) BLÁSTULA; g) GÁSTRULA; h) LARVA 1; i) LARVA 2

FONTE: O autor (2014)

embrionários, ectoderme, mesoderme e endoderme, nos organismos triblásticos, como é o caso de *Ascaris*.

As etapas de formação larval em *A. suum* são bastante discutidas, com alguns autores definindo até duas etapas anteriores (pré-larva) à formação da larva 1 (L1) (DMITRYJUK *et al.*, 2006; CRUZ *et al.*, 2012). Entretanto, a distinção entre estas etapas e as fases de gástrula e L1 não são muito evidentes, optando-se neste estudo em dividir o desenvolvimento larval em L1 e larva 2 (L2). A primeira larva formada apresenta esôfago rãbitóide e não é infectante até que seja realizada a primeira muda dentro do ovo. Durante a avaliação em microscopia óptica, foi possível identificar esta larva como apresentando formato de anel e estruturas mais densas e pouco definidas em seu interior (Figura 4.16-h).

Após a primeira muda realizada dentro do ovo, foi observada a formação de L2, larva filarióide, com formato mais longo que L1 e infectante (Figura 4.16-i). Alguns estudos indicam uma segunda muda dentro do ovo, originando a larva L3, similar ao que ocorre com *Ascaris lumbricoides* (MAUNG *et al.*, 1974; GEENEN *et al.*, 1999). Entretanto, o tempo para formação desta terceira forma larval seria de, aproximadamente, um mês após a formação de L2 (GEENEN *et al.*, 1999) e, portanto, não foi observada neste estudo.

#### 4.2.2.1 Influência da concentração de ovos de *Ascaris* no desenvolvimento embrionário do parasita

Ovos de *A. suum* contendo apenas uma célula podem ser viáveis e dar início a consecutivas divisões celulares, ou podem permanecer nesta fase, e não realizar as clivagens que levam à formação de larva. Neste último caso os ovos são considerados inviáveis, ou seja, sem condição de originar um indivíduo adulto. Entretanto, nem todos os ovos apresentam o mesmo tempo de desenvolvimento. Dependendo das condições do meio e das condições fisiológicas do organismo, um ovo viável pode dar início à sua divisão celular logo no primeiro dia, ou esperar uma semana ou mais para realizar a primeira clivagem.

Os fatores que influenciam o tempo de desenvolvimento de *Ascaris*, considerando-se condições de temperatura, umidade e aeração ótimas, ainda são desconhecidos. Entretanto, durante este estudo foi possível observar diferenças nos tempos de desenvolvimento dos ovos, quando incubados em diferentes concentrações. Nas Figuras 4.17 e 4.18 é apresentada a evolução da

embriogênese em ovos de *Ascaris suum* (N= 30), ao longo dos 21 dias monitorados, para as concentrações de 1600 ovos mL<sup>-1</sup> e 320 ovos mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Após o primeiro dia de incubação, a totalidade das amostras, em ambas as concentrações avaliadas, encontrava-se ainda com apenas uma célula. A primeira clivagem teve início no segundo dia para a maior concentração de ovos. No caso das amostras contendo as menores concentrações de *Ascaris*, o início observado foi mais lento, entretanto, a progressão observada foi mais acelerada, com 10% dos ovos dando início às divisões celulares já no terceiro dia de desenvolvimento.

A evolução para as outras etapas de desenvolvimento também ocorreu mais rapidamente quando a quantidade de ovos incubados foi menor (Figura 4.18). Uma possível explicação para este fato é que um meio menos concentrado, proporciona melhores condições de desenvolvimento para o ovo, principalmente em relação à quantidade de oxigênio disponível no meio.

A Tabela 4.4 apresenta a porcentagem de ovos encontrada em cada etapa de desenvolvimento, considerando-se os 21 dias avaliados e as duas concentrações ensaiadas. Analisando os resultados apresentados na tabela é possível afirmar que as divisões celulares dos ovos de *A. suum* aconteceram mais rapidamente em meio menos saturado. Como exemplo, após cinco dias de incubação, 63,4% dos ovos incubados em menor concentração já haviam realizado pelo menos uma clivagem celular, enquanto que, considerando-se a concentração de 1600 ovos mL<sup>-1</sup>, este valor foi de apenas 23,3%. Outra diferença significativa pôde ser observada durante as fases de mórula tardia e blástula. Em menor concentração de ovos, a observação da fase de mórula tardia coincide com a formação das primeiras blástulas; para as amostras contendo maior quantidade de ovos, o tempo entre as duas fases é de, aproximadamente, dois dias (Tabela 4.4).



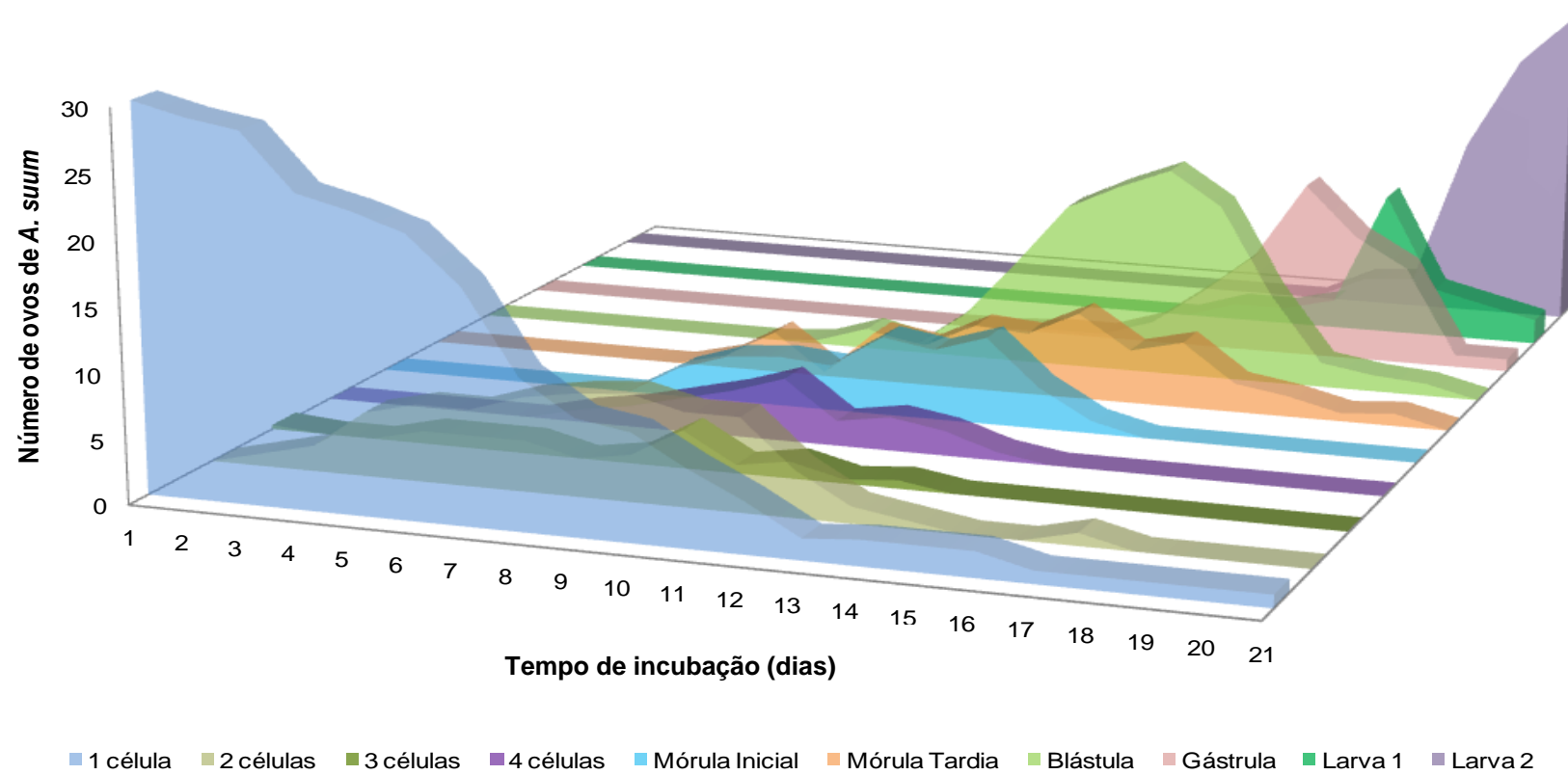


FIGURA 4.17 – DESENVOLVIMENTO DE OVOS DE *Ascaris suum* (N=30), EM CONCENTRAÇÃO DE 1600 OVOS mL<sup>-1</sup> E DURANTE 21 DIAS DE INCUBAÇÃO

FONTE: O autor (2014)



FIGURA 4.18 – DESENVOLVIMENTO DE OVOS DE *Ascaris suum* (N=30), EM CONCENTRAÇÃO DE 320 OVOS mL<sup>-1</sup> E DURANTE 21 DIAS DE INCUBAÇÃO

FONTE: O autor (2014)

O processo de muda larval também parece estar vinculado às alterações nas condições de incubação, devido às diferentes concentrações de ovos de *Ascaris*. Considerando-se as amostras mais concentradas, L1 foi observada pela primeira vez aos 15 dias de incubação, e L2 aos 17 dias. Este resultado está de acordo com outras observações encontradas na literatura para *A. suum*, em que períodos de muda larval entre 2 e 3 dias foram descritos (JOHNSON *et al.*, 1998; CRUZ *et al.*, 2012). Entretanto, em amostras contendo menor concentração de ovos, foi possível observar que ambas as formas larvais L1 e L2, apareceram simultaneamente nas amostras, indicando um período mais curto de muda larval (Tabela 4.4). Estímulo parecido parece estar associado às diferentes temperaturas de incubação dos ovos de *A. suum*. Kim e colaboradores (2012), estudando a embriogênese de ovos de *A. suum* em câmara de incubação com umidade controlada, e contendo areia como substrato, observaram que o tempo de formação da larva L1 foi reduzido em dois dias, aumentando-se a temperatura de incubação de 25 °C para 35 °C. Entretanto, a influência da concentração de ovos incubados de *A. suum* sobre o tempo de embriogênese do parasita ainda não foi descrito na literatura.

De acordo com os resultados observados, o terceiro dia de incubação apresentou maior similaridade na composição das fases embriogênicas entre as duas concentrações avaliadas (Tabela 4.4), sendo: 94% e 6% de ovos com uma e duas células, respectivamente, para a concentração de 1600 ovos mL<sup>-1</sup>; e 90% e 10% de ovos com uma e duas células, respectivamente, para a concentração de 320 ovos mL<sup>-1</sup>.

Desta forma, definiu-se este tempo de incubação para ser utilizado nos ensaios moleculares, visando à transcrição do RNA de *Ascaris suum*. Paralelamente, optou-se pela utilização de outros dois tempos de incubação, a saber: 7 e 21 dias. O tempo de incubação de 7 dias foi definido como um período intermediário para avaliar a expressão do gene *alep1*, considerando-se que neste período deve ocorrer a eliminação de parte do genoma de *Ascaris* que contém o gene (etapa de mórula inicial). Definiu-se também a realização de ensaios moleculares aos 21 dias, quando a maior parte dos ovos encontra-se larvado (L2), em ambas as concentrações estudadas.

TABELA 4.4 – QUANTIDADE DE OVOS DE *A. SUUM* (%) EM CADA ETAPA DA EMBRIOGÊNESE, POR DIA DE INCUBAÇÃO E EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ENSAIO

dias	1600 ovos mL <sup>-1*</sup>										320 ovos mL <sup>-1*</sup>									
	1c	2c	3c	4c	MI	MT	B	G	L1	L2	1c	2c	3c	4c	MI	MT	B	G	L1	L2
1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	96,7	3,3	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	94	6	0	0	0	0	0	0	0	0	90	10	0	0	0	0	0	0	0	0
4	80	16,7	3,3	0	0	0	0	0	0	0	50	43,3	0	6,7	0	0	0	0	0	0
5	76,7	20	3,3	0	0	0	0	0	0	0	36,7	23,3	6,7	16,7	16,7	0	0	0	0	0
6	73	20	3,5	3,5	0	0	0	0	0	0	26,7	16,7	3,3	13,3	30	6,7	3,3	0	0	0
7	60	23,3	0	6,7	6,7	3,3	0	0	0	0	16,7	13,3	3,3	0	6,7	33,3	26,7	0	0	0
8	36,7	26,7	3,3	10	13,3	10	0	0	0	0	23,3	3,3	0	0	10	16,7	46,7	0	0	0
9	30	26,7	10	13,3	13,3	0	6,7	0	0	0	16,7	10	0	0	6,7	33,3	33,3	0	0	0
10	26,7	23,3	3,3	16,7	13,3	13,3	3,3	0	0	0	10	6,7	0	0	0	40	36,6	6,7	0	0
11	20	20	10	6,7	20	10	13,3	0	0	0	6,7	6,7	0	0	0	13,3	23,3	50	0	0
12	13,3	13,3	0	10	20	16,7	26,7	0	0	0	6,7	0	3,3	0	3,3	3,3	30	53,4	0	0
13	6,7	3,3	3,3	6,7	23,3	16,7	40	0	0	0	3,3	0	0	0	0	0	6,7	23,4	33,3	33,3
14	6,7	3,3	0	3,3	10	23,3	50	3,3	0	0	3,3	0	0	0	0	3,3	13,3	6,7	36,7	36,7
15	6,7	0	0	0	3,3	13,3	56,7	16,7	3,3	0	3,3	0	0	0	0	3,3	3,3	3,3	50	36,8
16	6,7	0	0	0	0	16,7	46,7	26,7	3,3	0	3,3	0	0	0	0	3,3	6,7	40	46,7	
17	3,3	3,3	0	0	0	6,7	23,3	46,7	10	6,7	3,3	0	0	0	0	3,3	10,1	40	43,3	
18	3,3	0	0	0	0	6,7	6,7	40	36,7	6,7	3,3	0	0	0	3,3	6,7	3,3	30	53,3	
19	3,3	0	0	0	0	3,3	6,7	26,7	13,3	46,7	3,3	0	0	0	0	0	10	20	66,7	
20	3,3	0	0	0	0	3,3	3,3	6,7	10	73,3	3,3	0	0	0	3,3	16,7	0	3,4	73,3	
21	3,3	0	0	0	0	0	0	3,3	6,7	86,7	3,3	0	0	0	0	0	0	0	3,4	93,3

Notas: \* valores em%; 1c- 1 célula; 2c- 2 células; 3c- 3 células; 4c- 4 células; MI- mórula inicial; MT- mórula tardia; B- blástula; G- gástrula; L1- larva 1; L2- larva 2. Valores em destaque indicam o primeiro dia de observação da fase de desenvolvimento associada, nas concentrações: 1.600 ovos mL<sup>-1</sup> (amarelo) e 320 ovos mL<sup>-1</sup> (verde)

FONTE: O autor (2014)

#### 4.2.2.2 Tabela de vida e análise do grau de correlação entre o tempo de incubação e o desenvolvimento embrionário de *A. suum*

Outra forma de visualizar a dinâmica da embriogênese do parasita *Ascaris*, em particular o início do processo da divisão celular, pode ser obtida utilizando-se uma tabela de vida de coorte. A tabela de vida, construída para ambas as concentrações de ovos, com  $N_0 = 30$ , e de acordo com os cálculos das variáveis apresentados no Quadro 3.2, é apresentada na Tabela 4.5.

TABELA 4.5 – TABELA DE VIDA DE *ASCARIS SUUM* PARA AS CONCENTRAÇÕES 1600 OVOS mL<sup>-1</sup> e 320 OVOS mL<sup>-1</sup>

x	1600 ovos mL <sup>-1</sup>					320 ovos mL <sup>-1</sup>				
	N <sub>x</sub>	l <sub>x</sub>	d <sub>x</sub>	q <sub>x</sub>	p <sub>x</sub>	N <sub>x</sub>	l <sub>x</sub>	d <sub>x</sub>	q <sub>x</sub>	p <sub>x</sub>
1	30	0,967	1	0	1	30	1	0	0	1
2	29	0,967	1	0,03	0,97	30	1	3	0,10	0,90
3	28	0,933	4	0,14	0,86	27	0,90	12	0,44	0,56
4	24	0,800	1	0,04	0,96	15	0,50	4	0,27	0,73
5	23	0,767	1	0,04	0,96	11	0,37	3	0,27	0,73
6	22	0,733	4	0,18	0,82	8	0,27	1	0,13	0,88
7	18	0,600	7	0,39	0,61	7	0,23	2	0,29	0,71
8	11	0,367	2	0,18	0,82	5	0,17	0	0	1
9	9	0,300	1	0,11	0,89	5	0,17	2	0,40	0,60
10	8	0,267	2	0,25	0,75	3	0,10	1	0,33	0,67
11	6	0,200	2	0,33	0,67	2	0,07	0	0	1
12	4	0,133	2	0,50	0,50	2	0,07	1	0,50	0,50
13	2	0,067	0	0	1	1	0,03	0	0	1
14	2	0,067	0	0	1	1	0,03	0	0	1
15	2	0,067	0	0	1	1	0,03	0	0	1
16	2	0,067	1	0,50	0,50	1	0,03	0	0	1
17	1	0,033	0	0	1	1	0,03	0	0	1
18	1	0,033	0	0	1	1	0,03	0	0	1
19	1	0,033	0	0	1	1	0,03	0	0	1
20	1	0,033	0	0	1	1	0,03	0	0	1
21	1	0,033	0	0	1	1	0,03	0	0	1

Notas:  $N_0 = 30$ ; x- dias de incubação dos ovos;  $N_x$ - número de ovos não embrionados em x;  $l_x$ - proporção de ovos não embrionados em x;  $d_x$ - número de ovos embrionados no intervalo x e (x+1);  $q_x$ - probabilidade de um ovo embrionar no intervalo x e (x+1);  $p_x$ - probabilidade de um ovo não embrionar no intervalo x e (x+1)

FONTE: O autor (2014)

A adaptação e a utilização de uma tabela de vida neste estudo teve como objetivo a criação de um mecanismo útil para o acompanhamento da dinâmica do início da divisão celular de *Ascaris*. O interesse foi manter a ideia conceitual de uma tabela de vida da ecologia populacional, ou seja, uma ferramenta capaz de monitorar alterações no estado fisiológico de um indivíduo ou população. Considerando-se o processo de embriogênese do parasita, a diferença é que esta alteração não deverá ocorrer via um estímulo negativo, como a morte dos indivíduos, mas via um estímulo positivo, de passagem da condição de ovo não embrionado, para ovo em embriogênese, ou viável.

É possível perceber que, de maneira similar ao que ocorre com as tabelas de vida clássicas, a tendência é que a probabilidade de mudança de estado ( $q_x$ ) seja baixa no início do tempo monitorado. No caso de *A. suum*, esta mudança significa a primeira clivagem da célula do embrião, e o tempo para que isso ocorra está relacionado ao processo de transição do parasita de um meio adverso, sem condições adequadas de temperatura, umidade e aeração, para outro, adequado ao seu desenvolvimento.

Analisando os dados apresentados na Tabela 4.5, várias informações a respeito do desenvolvimento de *Ascaris* podem ser obtidas, auxiliando na compreensão do comportamento do parasita durante sua etapa de incubação. A incubação é exigida na maior parte das metodologias de determinação e quantificação de ovos viáveis de *Ascaris*, para a indução do desenvolvimento dos ovos e verificação de sua viabilidade. Desta forma, com base na tabela de vida construída, algumas características do desenvolvimento de *A. suum* podem ser elencadas:

- a proporção de ovos não embrionados do parasita ( $l_x$ ), em ambas as concentrações, diminui até manter-se constante. Isso porque os ovos só podem se desenvolver até o limite de sua população viável. A porcentagem restante de  $l_x$  refere-se, portanto, aos ovos inviáveis das amostras (3% para ambas as concentrações);
- pode-se constatar, pela análise da variável  $d_x$  na Tabela 4.5, que o início da embriogênese de *Ascaris suum* não é um processo fácil de ser predito. A primeira clivagem celular pode ocorrer tanto no primeiro dia, quanto após 16 dias de incubação, conforme pode ser observado para a

concentração de 1600 ovos mL<sup>-1</sup>. É possível, entretanto, estabelecer a probabilidade de que a primeira clivagem aconteça em um determinado intervalo. Como exemplo, entre o terceiro e o quarto dia de incubação, há 14% de chance de um ovo se dividir, considerando-se a maior concentração de ovos incubada. No mesmo período, este valor sobe para 44%, para a concentração de 320 ovos mL<sup>-1</sup>;

- A distribuição da quantidade de ovos embrionados por intervalo de tempo ( $d_x$ ) é mais gradual para a maior concentração de ovos de *A. suum*, evidenciando o que tinha sido observado anteriormente, isto é, que a evolução da embriogênese vai ocorrer mais rapidamente em menores concentrações de ovos do parasita.

As diferenças observadas no desenvolvimento dos ovos de *Ascaris* parecem relacionadas a outros fatores que não só o tempo de incubação em condições adequadas. Uma forma de avaliar o grau de correlação entre o tempo de incubação e o desenvolvimento embrionário de ovos de *A. suum* é a aplicação de teste de Mantel de correlação entre matrizes.

Normalmente utilizado para investigar a significância estatística entre uma matriz genética e uma matriz espacial, neste estudo o teste de Mantel foi aplicado na investigação da correlação entre uma matriz de desenvolvimento embrionário de ovos de *A. suum* (dita matriz ontogenética) e o tempo de incubação destes ovos (matriz temporal). O teste foi aplicado separadamente para cada concentração de ovos. Na Figura 4.19 é apresentada a saída dos resultados obtidos, utilizando-se o software Bioestat, versão 5.0.

Os valores de significância encontrados (p-valor) indicam uma associação significativa entre as matrizes para ambas as concentrações ( $p < 0,05$ ). Esta associação era esperada, pois o desenvolvimento do parasita deve apresentar uma correlação significativa com o tempo de incubação. O interesse na realização do teste, entretanto, foi verificar o grau de correlação entre tempo e desenvolvimento embrionário, para cada concentração de ovos avaliada.

O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) encontrado para as amostras de 1600 ovos mL<sup>-1</sup> e 320 ovos mL<sup>-1</sup> foi igual a 0,396 e 0,459, respectivamente. Os resultados indicam haver uma maior correlação entre o tempo de incubação e o desenvolvimento embrionário para a menor concentração de ovos do parasita.

A menor correlação entre o tempo de incubação e o desenvolvimento embrionário observada para a concentração de 1600 ovos mL<sup>-1</sup>, pode explicar a diferença na embriogênese de *Ascaris* em diferentes concentrações de ovos, já apresentada nas seções anteriores. Uma menor dependência do tempo de incubação pode estar associada à presença de agentes limitantes no meio, como baixa concentração de oxigênio ou saturação com metabólitos tóxicos, o que adiará o início das divisões celulares do parasita. A confirmação da relação entre a quantidade de ovos incubados e o tempo necessário para início das divisões celulares de *Ascaris* permite a elaboração de estratégias mais adequadas para o desenvolvimento de ensaios biológicos associados às fases iniciais de desenvolvimento do parasita.

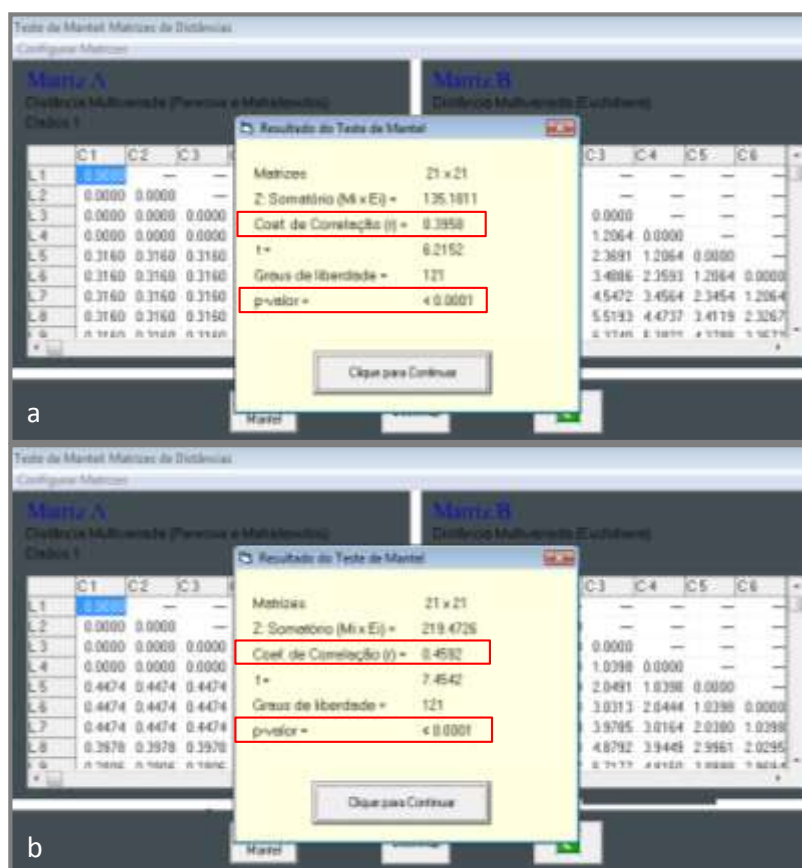


FIGURA 4.19– INTERFACE ENTRE O PROGRAMA BIOESTAT 5.0 E A SAÍDA DOS RESULTADOS OBTIDOS PELO TESTE DE MANTEL: a) 1600 OVOS mL<sup>-1</sup>; b) 320 OVOS mL<sup>-1</sup>

FONTE: O autor (2015)

Nota: coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância da correlação (valor p) em destaque nos retângulos vermelhos



### 4.2.3 Análises moleculares

Os resultados apresentados a seguir referem-se aos ensaios realizados para obtenção e amplificação do cDNA *alep1* de *A. suum*, visando à determinação molecular dos ovos do parasita.

#### 4.2.3.1 Lise dos ovos de *Ascaris suum*

Ovos de *Ascaris* são uma das estruturas biológicas mais resistentes de que se tem conhecimento (WHARTON, 1980; PECSON e NELSON, 2005). Sua espessa casca, conforme apresentado e discutido na Seção 4.2.1, confere extrema resistência estrutural frente à ação de agentes químicos, físicos ou biológicos. Desta forma, a fim de se definir qual a técnica de lise mais adequada para o rompimento destas estruturas, foram avaliados cinco tipos de tratamentos, considerando-se as vias química, física e enzimática. Na Tabela 4.6 é apresentada uma síntese dos tratamentos aplicados e sua efetividade em relação à lise dos ovos de *A. suum*.

O tratamento químico utilizou a ação combinada de dois agentes de ataque à membrana: hidróxido de sódio 0,5 N e hipoclorito de sódio 4%. O NaOH 0,5 N atua sobre a camada protéica mais externa da casca, além de remover a membrana mamilonada, quando presente no ovo. Para que a ação deste composto seja eficaz, é necessário um longo tempo de contato, o que é garantido pela incubação por até 16 horas, com agitação a 4 °C. A ação do NaClO 4%, por sua vez, é sobre a membrana quitinosa, a mais resistente dentre as camadas da casca de *Ascaris*. A potente ação oxidante do hipoclorito age sobre os polissacarídeos presentes nesta membrana, oxidando grupos primários de álcool a carboxilatos (DE NOOY *et al.*, 2000). Entretanto, apesar da remoção parcial das membranas externas, não foi possível observar a lise completa dos ovos utilizando-se os agentes químicos. Na Figura 4.20-a é apresentado um ovo de *A. suum*, visualizado em microscopia óptica, após ter sido submetido ao tratamento químico descrito.

O tratamento enzimático baseou-se no uso combinado de duas enzimas hidrolíticas, a saber: 2 mg mL<sup>-1</sup> de proteinase K na etapa inicial, e 10 mg mL<sup>-1</sup> de lisozima em etapa posterior. A proteinase K é uma enzima da classe das serino-

proteases, atuando sobre ligações peptídicas após aminoácidos hidrofóbicos, e tem sua atividade otimizada na presença de SDS, que age como um forte desnaturante protéico. Desta forma, a aplicação desta enzima visou ao rompimento da membrana vitelínica, camada mais externa, e de constituição protéica, presente na casca dos ovos de *A. suum*. A lisozima, por sua vez, atua sobre peptideoglicanos, sendo bastante utilizada no rompimento da parede celular de bactérias, em especial, gram-positivas (CHASSY e GIUFFRIDA, 1980). Assim, sua ação sobre a membrana quitinosa do ovo de *Ascaris* foi investigada durante o tratamento realizado. Entretanto, os resultados observados pela ação enzimática (Figura 4.20-b) não foram satisfatórios, e mesmo parte da membrana mamilonada ainda permaneceu intacta após o tratamento.

TABELA 4.6 – TRATAMENTOS DE LISE DE OVOS DE *A. SUMM* AVALIADOS DURANTE ESTE ESTUDO

Via	Tratamento	Tempo <sup>1</sup>	Custo <sup>2</sup>	Lise
Química	NaOH 0,5 N + NaClO 4%	14-16h	+	NO
Enzimática	Proteinase K 2 mg mL <sup>-1</sup> + Lisozima 10 mg mL <sup>-1</sup>	14-16 h	++	NO
	Ultrassom 40 kHz	30 min	++	NO
Mecânica	Nitrogênio Líquido	25 min	+++	parcial
	Micropérolas de vidro 0,1 mm	1 min	+	completa

Notas: <sup>1</sup>tempo referente à etapa mais longa; <sup>2</sup>custo comparativo: + baixo, ++ médio, +++ alto; NO- não observada

FONTE: O autor (2014)

Com exceção da ultrassonicação, os tratamentos utilizados pela via mecânica, para o rompimento dos ovos de *A. suum*, foram mais eficazes. No caso da aplicação de ondas de ultrassom, a estrutura do ovo manteve-se intacta, apesar de algumas modificações morfológicas terem sido observadas, interferindo, inclusive, na coloração do material em microscopia óptica (Figura 4.20-c).

No caso do tratamento por choque térmico, utilizando-se ciclos rápidos de resfriamento em nitrogênio líquido e aquecimento a 65 °C foi possível observar pontos de maior fragilidade na casca, com escape de material celular, conforme

pode ser observado na Figura 4.20-d. O processo de lise, porém, não foi completo, e o tratamento não foi considerado adequado aos propósitos deste estudo.

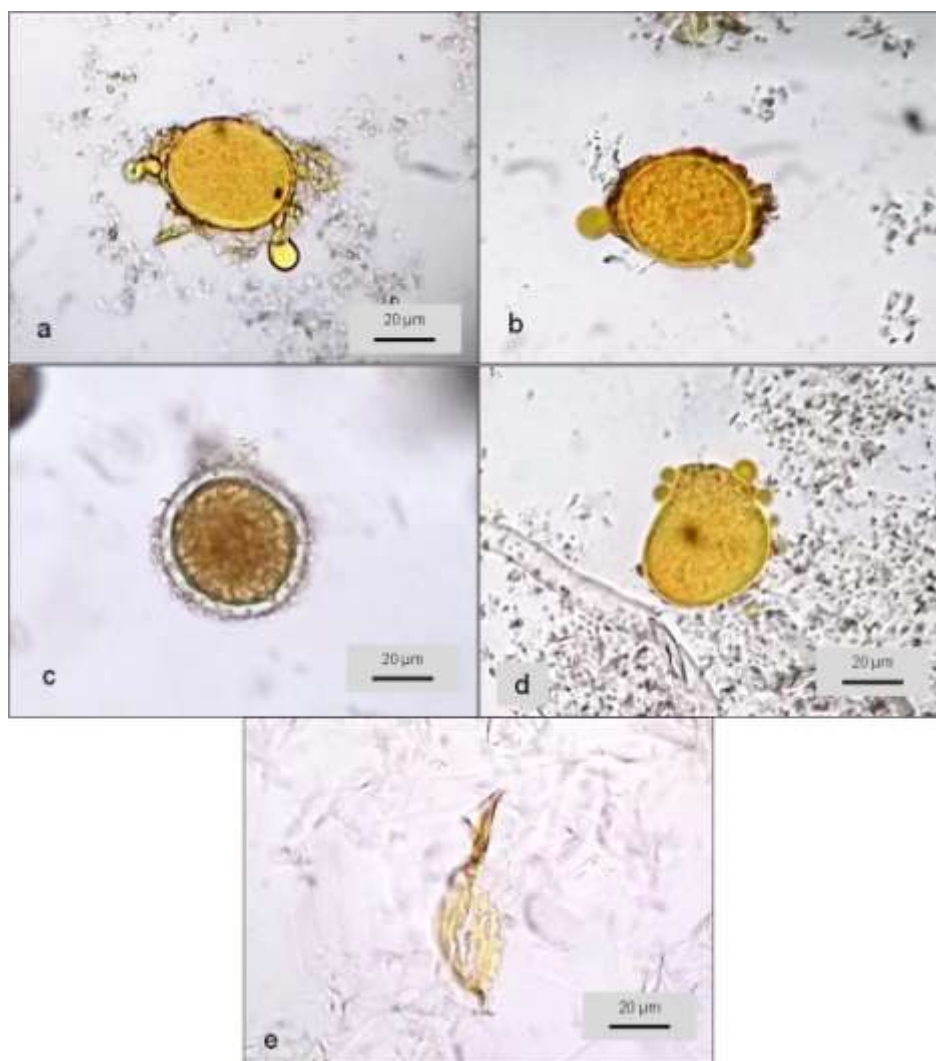


FIGURA 4.20 – OVOS DE *A. Suum* VISUALIZADOS APÓS TRATAMENTO DE LISE POR: a) VIA QUÍMICA; b) VIA ENZIMÁTICA; c) ULTRASSONICAÇÃO; d) NITROGÊNIO LÍQUIDO; e) MICROPÉROLAS DE VIDRO

FONTE: O autor (2014)

O tratamento de lise por via mecânica, utilizando-se micropérolas de vidro, com diâmetro de 0,1 mm, foi aquele que apresentou melhores resultados, com o rompimento completo da maior parte dos ovos visualizados. Na Figura 4.20-e é possível visualizar vestígios da casca lisada, após o tratamento com as micropérolas. Conforme discutido na Seção 4.2.1, a resistência estrutural dos ovos de *Ascaris*, principalmente devido à espessa membrana quitinosa, deve exigir

metodologias mais drásticas de lise. A ação das micropérolas está associada ao cisalhamento causado por estas estruturas, quando submetidas, juntamente com os ovos, à centrifugação a 4500 x g.

Além de mais efetivo, o tratamento utilizando-se micropérolas de vidro apresenta tempo de ensaio e custo reduzidos, quando comparado aos demais tratamentos avaliados (Tabela 4.6). Desta forma, este método foi escolhido como o mais adequado à lise dos ovos de *A. suum*, para recuperação e purificação do material genético do parasita.

#### 4.2.3.2 Extração do RNA e síntese do cDNA de *Ascaris suum*

Previamente à realização da PCR, foi necessário extrair o RNA de *A. suum* em quantidade suficiente para a síntese de cDNA e posterior amplificação. Assim, foi estabelecido um protocolo para que o material genético fosse extraído com qualidade adequada e pudesse ser amplificado na reação da PCR sem a presença de interferentes à reação enzimática de amplificação.

As suspensões contendo as concentrações de ovos definidas para a realização dos ensaios moleculares (Seção 3.2.3.1), após a lise utilizando-se as micropérolas de vidro, foram submetidas às etapas de extração e purificação de RNA, utilizando-se dois protocolos distintos, a saber: a) método do fenol-guanidina (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 2006), e b) *kit* comercial *Axyprep multisource total RNA mini-prep kit* (AXYGEN). É importante salientar que, para a obtenção de RNA íntegro, ou seja, não degradado pela ação de nucleases presentes no ambiente, todo o material e soluções utilizadas para o processamento do material devem ser livres de RNAses. O *kit*, nesta situação, leva vantagem por apresentar soluções reagentes e insumos previamente esterilizados e sem a presença de RNase, conforme atestado pelo fornecedor. No caso das soluções preparadas para a realização do protocolo desenvolvido por Chomczynski e Sacchi, foi utilizada solução de Dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,5%, seguido de autoclavação, para inativar as nucleases presentes.

O método do fenol-guanidina apresentou bom rendimento, extraíndo entre 250 e 350 ng de RNA total, por  $\mu$ L de solução. Entretanto, a purificação do RNA não foi adequada, e as relações espectrofotométricas A260/ A280 e A260/ A230, obtidas no equipamento Nanodrop foram, respectivamente, iguais a 1,74 e 1,63. É

importante salientar que a presença de contaminação em amostras de DNA e RNA pode ser avaliada pelas relações de absorvância obtidas após leitura em espectrofotômetro: a) 260 nm e 280 nm (A260/ A280), utilizada para avaliar a contaminação com proteínas; e b) 260 nm e 230 nm (A260/ A230), que verifica a contaminação por outros compostos, como sais, clorofórmio, fenol e guanidina. Relações consideradas ideais encontram-se entre 2,0 e 2,2 para DNA, e entre 1,8 e 2,0 para RNA. Relações abaixo destes valores, portanto, são indicativas de contaminação do material extraído.

Uma forma de remover contaminantes após a extração do RNA, especialmente ao utilizar-se o método do fenol-guanidina, é com o uso de solução de cloreto de lítio (LiCl) 10 mM. Este sal auxilia na precipitação do RNA da solução contaminada, formando um sedimentado que, após lavagem com etanol a 70%, encontra-se livre de grande parte dos contaminantes oriundos dos reagentes de extração. Entretanto, uma desvantagem do método, é a considerável perda de rendimento após o tratamento. De fato, durante os ensaios deste estudo, as amostras de RNA que haviam sido obtidas pelo método do fenol-guanidina apresentaram redução de aproximadamente 85% no rendimento, após o tratamento com cloreto de lítio.

O principal problema associado à presença de contaminantes nas amostras é a interferência na realização da PCR, devido à inibição da atividade da enzima DNA polimerase. A obtenção do DNA complementar (cDNA) envolve a enzima transcriptase reversa, e sua síntese, assim como a PCR, fica comprometida na presença de impurezas nas amostras. Com efeito, o cDNA obtido após o método de extração do fenol-guanidina apresentou baixo rendimento, além da presença de contaminantes. Por outro lado, o RNA total extraído das suspensões de ovos utilizando-se o *kit* comercial serviu como molde para a síntese de cDNA com elevado rendimento, e relações A260/ A280 e A260/ A230 iguais a 1,8 e 2,16, respectivamente, foram obtidas. É importante salientar que a leitura de cDNA no equipamento Nanodrop<sup>®</sup> também leva em consideração a presença de outros nucleotídeos, como os dNTPs e iniciadores utilizados no ensaio de RT, além do RNA remanescente nas amostras; mesmo assim, a quantidade de cDNA obtida foi bastante alta, assegurando sua aplicação nos ensaios de amplificação, cujos resultados são apresentados e discutidos nas seções a seguir.

#### 4.2.3.3 PCR convencional

Após obtenção do cDNA de *Ascaris suum*, foi realizada uma PCR convencional, tendo como alvo o gene mitocondrial do citocromo b (mt-cytB). Genes mitocondriais são expressos constitutivamente em um organismo. Assim, o gene mt-cytB foi escolhido como alvo para avaliar a qualidade do cDNA sintetizado. Como o custo de uma PCR convencional é reduzido em relação à qPCR, estes ensaios foram realizados como uma verificação da qualidade do cDNA, previamente à realização dos ensaios de PCR em tempo real.

Como resultado, todas as suspensões de ovos ensaiadas apresentaram produto de amplificação; entretanto, foi observado um arraste de bandas, referente à amplificação inespecífica. Desta forma, outras sequências, que não aquela referente ao mt-CytB, podem ter sido reconhecidas pelos iniciadores utilizados e amplificadas pela Taq DNA polimerase. Uma explicação provável está relacionada à temperatura de anelamento de 52 °C, utilizada de acordo com o protocolo definido por Loreille e colaboradores (2001), utilizado para este ensaio. Baixas temperaturas de anelamento aumentam a inespecificidade no reconhecimento dos iniciadores, gerando o padrão de bandas arrastadas que pôde ser observado. Entretanto, apesar da baixa especificidade da amplificação, os ensaios permitiram confirmar a presença do cDNA de *Ascaris* nas amostras, o que favoreceu a realização dos ensaios em tempo real para amplificação do cDNA alvo (alep1).

#### 4.2.3.4 Amplificação em tempo real (qPCR) do cDNA de *A. suum*

Após a obtenção do cDNA total de *Ascaris suum*, foi realizada a amplificação em tempo real (qPCR) utilizando-se o conjunto de sonda e de iniciadores para reconhecimento da região gênica alep1, descrito na Seção 3.2.3.5.1. Conforme apresentado na Seção 3.2.3.1, as suspensões de ovos de *A. suum* utilizadas nos ensaios moleculares foram preparadas contendo concentrações de 8000 ovos mL<sup>-1</sup>, 1600 ovos mL<sup>-1</sup>, 320 ovos mL<sup>-1</sup> e 64 ovos mL<sup>-1</sup>. Estas concentrações são referentes à diluição seriada 1:5 da suspensão padrão (4 x 10<sup>4</sup> ovos mL<sup>-1</sup>), e foram escolhidas com base em dois critérios, a saber:

a) para ensaios de quantificação absoluta (curva de calibração) em qPCR é altamente recomendado que se utilize um intervalo amplo de pontos, com pelo menos três ordens de grandeza. Desta forma, assegura-se a melhor eficiência de

amplificação pela técnica (BUSTIN *et al.*, 2009);

b) optou-se por uma faixa de valores capaz de abranger quantidades variadas de ovos de *Ascaris*, desde baixas e médias concentrações, utilizadas nos ensaios *split/spike*, até elevadas concentrações de ovos, que podem ser encontradas em regiões endêmicas ou utilizadas para avaliação da eficiência de tratamentos de higienização de lodos. Foram realizadas amplificações em tempo real das suspensões incubadas por 3, 7 e 21 dias. Esta primeira etapa de ensaios de qPCR visou à verificação da presença de sinal de amplificação do cDNA alvo nas amostras e como as quantidades deste cDNA relacionam-se com as diferentes concentrações de ovos de *A. summ* avaliadas.

Para os ensaios realizados após três dias de incubação, foi possível observar a amplificação dos pontos contendo 8000 ovos e 1600 ovos. Na Figura 4.21 é apresentado o gráfico de amplificação obtido, em que podem ser visualizadas as curvas exponenciais referentes a estas quantidades. Os valores de Cq (Ct) observados nestas condições foram iguais a  $36,3 \pm 0,2$ , para 8000 ovos, e  $37,7 \pm 0,4$ , para 1600 ovos.

Conforme apresentado anteriormente, menores valores de número do ciclo de quantificação (Cq) correspondem à maior quantidade de cDNA alvo no início da amplificação. Assim, os valores encontrados foram de acordo com o esperado, com a maior quantidade de ovos (8000) apresentando o menor Cq. Outras quantidades de ovos, entretanto, não foram amplificadas. Uma explicação é que a quantidade do RNA alvo transcrito nestas suspensões, após três dias de incubação, ainda foi insuficiente para detecção de sinal de amplificação, considerando-se os 50 ciclos utilizados. Mesmo para as quantidades de ovos que efetivamente foram amplificadas, os valores de Cq foram elevados, o que pode ser justificado pelo fato do gene *alep1* ser um gene de cópia única e, portanto, apresentar número de transcritos relativamente baixos, considerando-se outros genes em maior cópia no genoma, como o ITS-1 (42 cópias) (PECSON *et al.*, 2006). A maior estabilidade e longevidade do RNA de *alep1*, entretanto, pode ser uma vantagem em relação a outros RNAs transcritos em grande quantidade, porém, com baixo tempo de permanência na célula (SPICHER *et al.*, 1994).

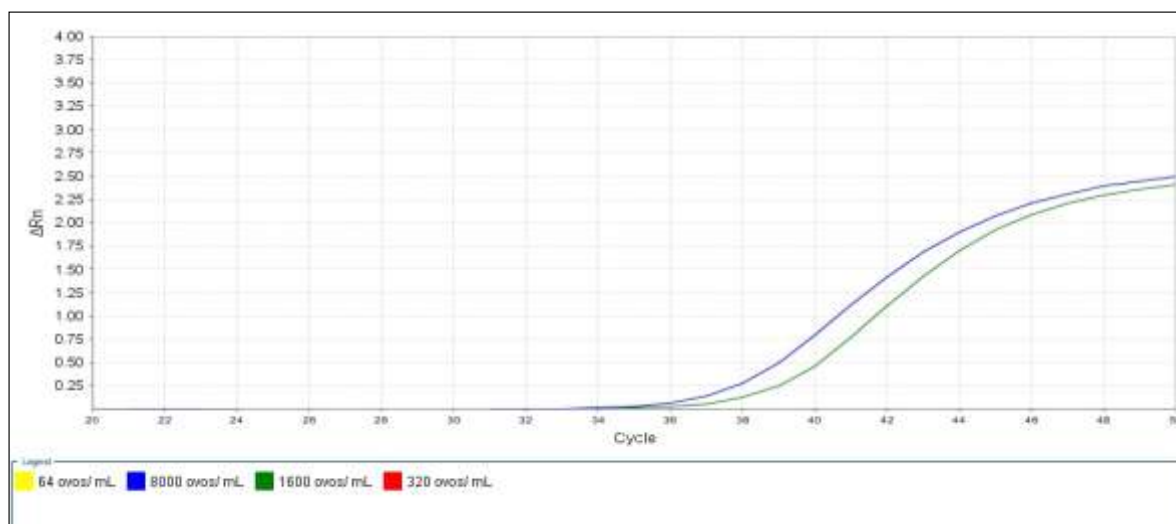


FIGURA 4.21 – AMPLIFICAÇÃO LINEAR DO cDNA DE *A. suum* OBTIDO A PARTIR DE SUSPENSÕES DE OVOS INCUBADOS POR TRÊS DIAS

FONTE: O autor (2014)

Novo ensaio foi realizado com as amostras do cDNA de *alep1* após 3 dias de incubação. Desta vez, entretanto, utilizou-se cDNA sintetizado a partir da suspensão mais concentrada de RNA, obtida pela menor adição de diluente ao final da etapa de extração (Seção 3.2.3.3). Desta vez foi possível visualizar a amplificação dos quatro padrões utilizados (Figura 4.22). Os valores de Cq obtidos neste ensaio foram iguais a  $34,75 \pm 2,9$ ;  $37,39 \pm 1,1$ ;  $37,53 \pm 1,5$ ;  $37,56 \pm 1,5$ , para os padrões de 8000, 1600, 320 e 64 ovos, respectivamente.

A amplificação de todos os pontos, sem ruídos e de maneira constante, foi um grande passo para a otimização da metodologia biomolecular RT-qPCR para determinação e quantificação de ovos viáveis de *Ascaris*. As amostras de 3 dias, foram consideradas ideais para a amplificação, devido aos resultados observados no ensaio da embriogênese do parasita. Conforme apresentado e discutido na Seção 4.2.2, até o terceiro dia de incubação, a distribuição dos ovos nas fases de desenvolvimento do parasita é bastante similar nas diferentes concentrações de ovos estudadas.

Também a presença de sinal constante do cDNA de um RNA mensageiro, em fase inicial do desenvolvimento de *Ascaris* e presente em cópia única, evidencia a inovação do método aplicado. Isso porque a transcrição de RNA mensageiro nas células ocorre, muitas vezes, de maneira transiente, sendo difícil



a detecção de sinal mesmo por técnicas bastante sensíveis como a qPCR. De fato, Pecson e colaboradores (2006) justificam o uso de ITS-1, como alvo em uma reação de RT-qPCR devido à inconstância normalmente encontrada na transcrição de mRNA. ITS-1 é uma região transcrita juntamente com o RNA ribossomal do parasita e presente em grande quantidade nas células de *Ascaris*. O RNA de ITS-1 também foi avaliado como alvo nas reações de amplificação realizadas neste estudo.

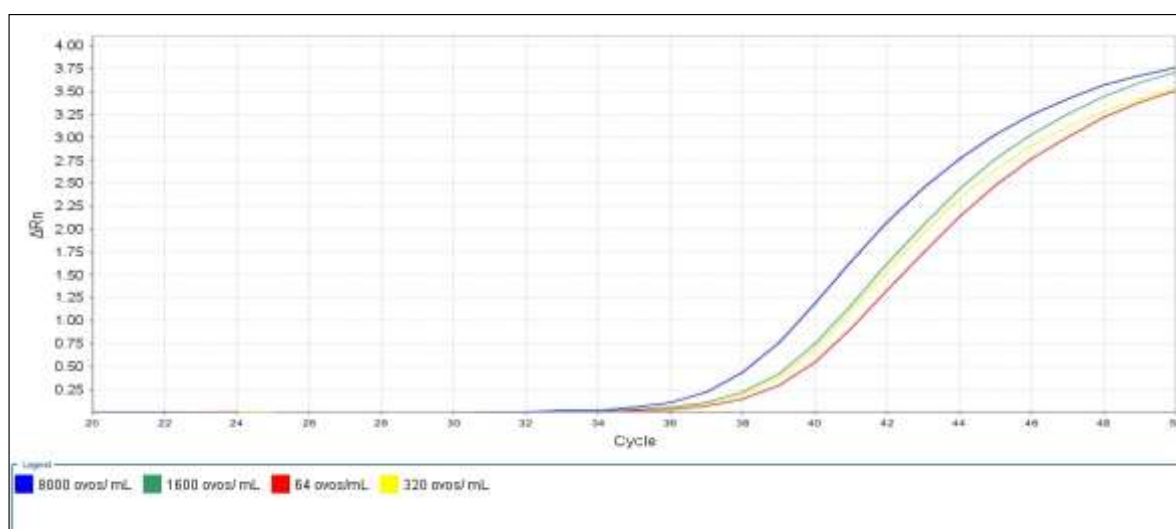


FIGURA 4.22 – AMPLIFICAÇÃO LINEAR DO cDNA CONCENTRADO DE *A. suum* OBTIDO A PARTIR DE SUSPENSÕES DE OVOS INCUBADOS POR TRÊS DIAS

FONTE: O autor (2014)

Os resultados obtidos para ITS-1, entretanto, não confirmam o uso dessa molécula como alvo ideal em uma metodologia de identificação e quantificação de ovos viáveis de *Ascaris*. Nos ensaios realizados com as amostras de três dias, que tiveram como objetivo comparar a resposta de amplificação àquelas obtidas com *alep1*, não foi observado sinal de amplificação para nenhum dos pontos avaliados. De volta ao estudo de Pecson *et al.* (2006), os autores, de fato, observaram que mesmo sendo um gene expresso em grande número de cópias no genoma do parasita, o sinal de amplificação, isto é, a detecção efetiva do RNA de ITS-1, só foi possível após seis dias de incubação e de forma inconstante ao longo do tempo.

A amplificação do mRNA de *alep1*, apesar de efetiva na determinação da presença do parasita nas amostras avaliadas, não possibilitou a quantificação do

alvo e, por conseguinte, o desenvolvimento de uma curva de calibração. Apesar de utilizadas concentrações dentro de um intervalo amplo, os valores de Cq resultantes ficaram muito próximos, o que inviabilizou a construção da curva. Uma possibilidade a ser considerada seria a baixa eficiência da amplificação em tempo real, devido à presença de agentes inibidores como ácidos húmicos, o que limitaria a amplificação do segmento alvo (SCHRIEWER et al., 2011). A origem dos ovos de *A. suum* utilizados neste estudo, isto é, isolados a partir do intestino de suínos, não descarta a possibilidade da presença, mesmo em baixas concentrações, de compostos inibidores que podem ter sido co-purificados com o RNA.

De qualquer forma, os resultados de amplificação das amostras após três dias de incubação permitiram comprovar que é possível utilizar-se o mRNA do parasita para a quantificação da expressão do gene *alep1*. A própria possibilidade de se identificar a presença ou ausência de ovos viáveis em uma amostra já justificaria o uso deste método na avaliação de processos de remoção completa de ovos viáveis de *Ascaris* em amostras ambientais.

Durante os ensaios moleculares utilizando outros tempos de incubação (7 e 21 dias) foi possível observar a amplificação de todos os pontos avaliados, com algumas diferenças, entretanto, em relação aos resultados obtidos aos três dias.

Assim, a amplificação aos sete dias de incubação também foi efetiva para os quatro pontos avaliados (Figura 4.23). Os valores de Cq para 8000 e 1600 ovos foram menores do que aqueles observados nos ensaios de 3 dias, indicando o aumento da quantidade de transcritos entre os dois períodos. Entretanto, ao contrário do que era esperado, os valores de Cq foram mais baixos para as suspensões contendo menores concentrações de ovos, a saber:  $28,6 \pm 0,5$  para 8000 ovos;  $28,3 \pm 1,9$  para 1600 ovos;  $27,8 \pm 0,6$  para 320 ovos, e  $26,9 \pm 0,5$  para 64 ovos. Uma possível explicação para estes resultados pode estar associada à embriogênese diferenciada entre concentrações distintas de ovos, conforme discutida na Seção 4.2.2 e apresentada na Tabela 4.4.

Considerando-se as concentrações de ovos iguais a 1600 ovos e 320 ovos (Tabela 4.4), é possível observar que a quantidade de células por ovo, aos sete dias de incubação, não é constante. Ou seja, em 1600 ovos, de acordo com o observado nos ensaios de embriogênese, há 60% de ovos contendo 1 célula; 23,3% contendo 2 células; 6,7% contendo 4 células; 6,7% de ovos em mórula

inicial e 3,3% em mórula tardia. Para 320 ovos, por sua vez, as quantidades de ovos nas diferentes fases apresentam uma diferença notável, sendo 16,7% de ovos com 1 célula; 13,3% de ovos com 2 células; 3,3% com 3 células; 6,7% em mórula inicial; 33,3% em mórula tardia e 26,7% de ovos já em fase de blástula. Assim, considerando-se uma média de 8 células para mórula inicial, 20 células na fase de mórula tardia e 64 células em blástula, pode-se estimar a quantidade total de células presentes em 1600 e 320 ovos como sendo, respectivamente, igual a 4048 células e 7941 células. Isto é, apesar de menor quantidade de ovos, a suspensão contendo 320 ovos mL<sup>-1</sup>, após incubação por sete dias, apresenta quase o dobro de células presentes na suspensão de 1600 ovos mL<sup>-1</sup>.

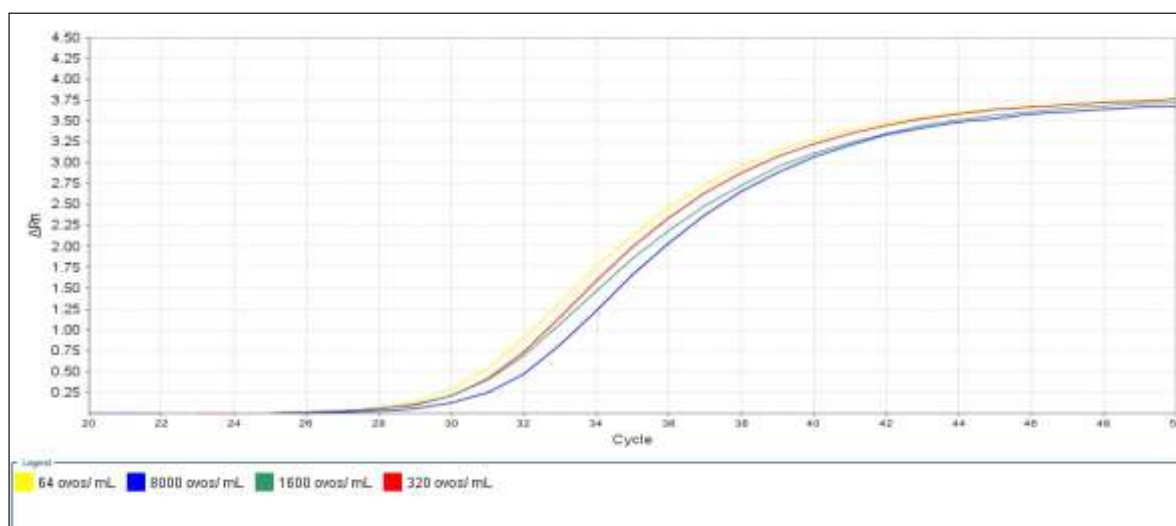


FIGURA 4.23 – AMPLIFICAÇÃO LINEAR DO cDNA DE *A. suum* OBTIDO A PARTIR DE SUSPENSÕES DE OVOS INCUBADOS POR SETE DIAS

FONTE: O autor (2014)

A variação existente no número de células presentes nas diferentes concentrações de ovos reflete-se na quantidade de RNA transcrito, que será tanto maior quanto maior for o número de células vivas no organismo. Assim, é provável que a variação na amplificação do cDNA de *Ascaris* observada neste período seja devido à variação no número de células existentes em cada quantidade de ovos de *A. suum* ensaiadas, após o período de sete dias de incubação. Desta forma, os resultados obtidos confirmam o melhor intervalo para realização dos ensaios moleculares como sendo 3 dias, pela baixa variação na embriogênese neste período, considerando-se concentrações distintas.

Ensaio de 21 dias também foram efetivos para a amplificação do cDNA alvo (Figura 4.24), apesar de já ter ocorrido, neste período, o fenômeno da redução cromossômica no parasita. Essa manutenção do sinal, muito provavelmente se deve, à estabilidade dos transcritos do parasita originário das regiões deletadas do genoma, que pode chegar até um mês, conforme descrito por Spicher e colaboradores (1994).

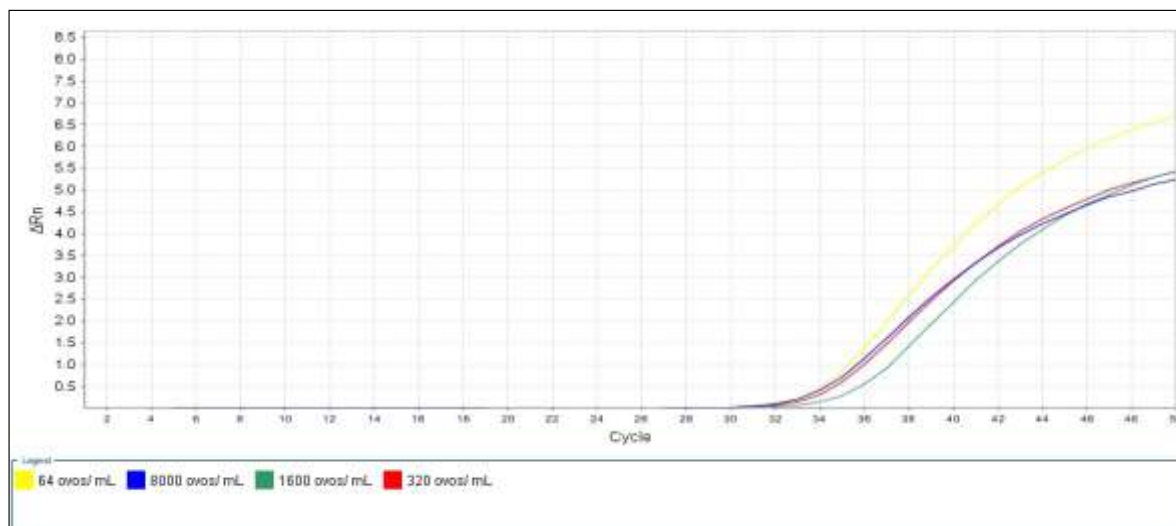


FIGURA 4.24 – AMPLIFICAÇÃO LINEAR DO cDNA DE *A. suum* OBTIDO A PARTIR DE SUSPENSÕES DE OVOS INCUBADOS POR 21 DIAS

FONTE: O autor (2014)

Os valores de Cq obtidos para estas amostras foram iguais a  $33,44 \pm 0,35$ ;  $34,98 \pm 1,4$ ;  $33,87 \pm 0,59$ ;  $33,34 \pm 0,39$ , para os padrões de 8000, 1600, 320 e 64 ovos, respectivamente. De forma similar ao que foi observado no ensaio realizado com as amostras de sete dias, concentrações maiores apresentaram Cq maiores, contrariando o que normalmente se espera em um ensaio de qPCR (Figura 4.27).

Apesar de grande parte dos ovos já se encontrarem larvados, nas diferentes concentrações aos 21 dias (Tabela 4.4), ainda assim é possível que haja grande variação no número de células e na quantidade de transcrito entre as diferentes concentrações, principalmente devido ao processo de crescimento e diferenciação larval durante este período. Com base nos resultados apresentados, a próxima etapa foi avaliar a aplicação do método desenvolvido na detecção de ovos viáveis de *A. suum* inoculados nas amostras de lodo coletadas.

#### 4.2.4 Determinação de ovos de *Ascaris* nas amostras de lodo de esgoto por método biomolecular

Conforme apresentado na seção anterior, mesmo não sendo possível a construção de uma curva de calibração para a quantificação dos ovos viáveis de *A. suum* utilizando-se o gene *alep1*, o método biomolecular foi capaz de detectar a presença do parasita em todos os ensaios. Desta forma, a próxima etapa foi avaliar a capacidade deste método em determinar a presença de ovos viáveis de *Ascaris* inoculados em amostras de lodo.

Conforme apresentado na Seção 3.2.4, as etapas do método biomolecular para determinação de ovos viáveis de *Ascaris* são: a) processamento das amostras para purificação e concentração dos ovos de *Ascaris* conforme metodologia USEPA (2003); b) incubação do material por 3 dias, a 28°C; c) lise celular e extração de mRNA; e d) síntese de cDNA e amplificação em equipamento SDS em tempo real.

Apesar das potenciais perdas associadas ao processamento das amostras pela metodologia da USEPA (2003), já apresentadas e discutidas na Seção 4.1.3.1, uma etapa de recuperação e purificação dos ovos é necessária em qualquer metodologia para determinação de ovos viáveis de *Ascaris*, seja pelo método convencional, molecular ou qualquer outro desenvolvido. Isto porque os ovos se encontram dispersos entre grande quantidade de sólidos nas amostras, sendo necessária sua concentração antes da aplicação de técnicas de detecção e quantificação (JIMÉNEZ, 2004). Mesmo técnicas capazes de extrair o material genético do parasita diretamente do lodo, esbarram na grande quantidade de material a ser processado, em geral 50 g de sólidos totais, o que torna o processo inviável.

É importante salientar que mesmo sendo necessária uma metodologia de concentração dos ovos, isto não implica no uso de forma indiscriminada de qualquer protocolo, sendo necessária a elaboração de metodologias condizentes com a realidade das amostras a serem ensaiadas (Seção 4.1.3.1).

Após a etapa de concentração, seguiu-se a incubação dos ovos pelo período de 3 dias, que foi definido, de acordo com os resultados produzidos nesta pesquisa, como o tempo de incubação mais adequado à aplicação do novo

método. A extração de RNA das amostras, utilizando-se previamente a lise celular por micropérolas de vidro, foi realizada de forma efetiva, resultando em grande quantidade de cDNA para os quatro tipos de lodo avaliados (AN, AC, BN, BC).

A quantidade e qualidade do material genético extraído das amostras de lodo atestam a efetividade do método desenvolvido para lise dos ovos, sabendo-se que ovos inseridos em uma matriz complexa como o lodo de esgoto tendem a se tornar ainda mais resistentes a processos visando ao rompimento de sua espessa casca (PECSON *et al.*, 2007).

Em relação à amplificação do cDNA obtido a partir das amostras de lodo, todas as amostras inoculadas (N = 33) apresentaram sinal de amplificação, com exceção de duas amostras de lodo aeróbio: BN1 e BC3, ambas na concentração de 10 ovos/ g ST. Estes resultados estão de acordo com a baixa recuperação observada para estas amostras pela aplicação do método convencional (Tabela 4.3). Nestes casos, a acurácia média observada foi igual a 4,7% e 5,3%, respectivamente. A perda ou inativação dos ovos durante a etapa de processamento da USEPA (2003) pode ter influenciado a ausência de amplificação para estas amostras no método biomolecular. Na Figura 4.25 é apresentada a curva de amplificação observada para o ensaio realizado com as amostras de lodo da primeira campanha de coletas.

A especificidade do método também mostrou-se adequada. Apenas uma das amostras controle contendo lodo sem inóculo apresentou sinal de amplificação. Apesar de não terem sido detectados ovos nestas amostras pelo método microscópico, não é possível descartar a possibilidade da existência, na amostra, de ovos de *Ascaris* resistentes ao processo de inativação por autoclavação. Em relação aos controles negativos, contendo água e os reagentes para amplificação, não houve detecção de sinal. O Quadro 4.1 apresenta os resultados obtidos para a amplificação do cDNA do lodo para a primeira campanha de coletas.

Resultados bem similares foram obtidos para as campanhas 2 e 3, com exceção da amostra BC3 contendo 10 ovos/ g que não apresentou sinal de amplificação, conforme discutido anteriormente. Assim como ocorreu com os padrões, os valores de Cq apresentaram valores muito próximos, impossibilitando que fosse explorada uma relação quantitativa entre as amostras. Entretanto, a

determinação da presença/ ausência de ovos viáveis nas amostras foi efetiva, confirmando a viabilidade do novo método desenvolvido.

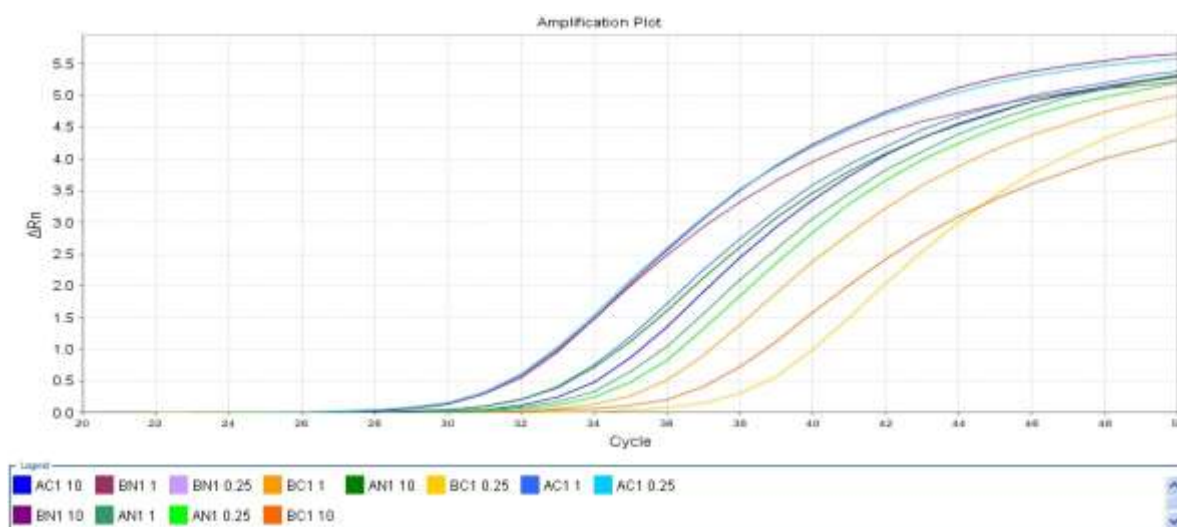


FIGURA 4.25 – AMPLIFICAÇÃO LINEAR DO cDNA DE *A. suum* OBTIDO A PARTIR DE AMOSTRAS DE LODO DA PRIMEIRA CAMPANHA DE COLETAS

FONTE: O autor (2015)

QUADRO 4.1 – PRESENÇA DE SINAL DE AMPLIFICAÇÃO E VALOR DE Cq PARA AMOSTRAS DE LODO DA PRIMEIRA CAMPANHA E INOCULADAS COM OVOS DE *A. suum*

Amostra	Concentração (ovos / g)	Amplificação	Cq
AN1	10	+	30,11 ± 0,17
	1	+	31,29 ± 0,24
	0,25	+	32,06 ± 1,57
AC1	10	+	32,4 ± 1,11
	1	+	30,3 ± 0,37
	0,25	+	28,7 ± 0,45
BN1	10	-	NA
	1	+	28,86 ± 0,20
	0,25	+	28,28 ± 0,57
BC1	10	+	33,42 ± 1,25
	1	+	33,49 ± 0,31
	0,25	+	33,26 ± 2,19

FONTE: O autor (2015)

Notas: Cq- ciclo de quantificação ou ciclo limite; + presença de sinal de amplificação; - ausência de sinal de amplificação, ± desvio padrão

Apesar de não ser possível a quantificação absoluta dos ovos com base nas curvas construídas, uma análise comparativa dos resultados pode ser interessante. Como exemplo, analisando a Figura 4.25 e os valores de Cq apresentados no Quadro 4.1, é possível observar que as amostras BC (10, 1 e 0,25 ovos/ gST) apresentaram os maiores valores de Cq entre as amostras de lodo analisadas. Isto é, sua amplificação ocorreu mais tardiamente, devido a menor quantidade de alvo (cDNA de *Ascaris*) nestas amostras. Esta resposta coincide não apenas com a baixa acurácia observada em análise microscópica, mas principalmente com as menores taxas de viabilidade observadas para estas amostras, entre todos os ensaios da metodologia convencional (Tabela 4.3). O método, portanto, além de identificar a presença de ovos viáveis de *Ascaris* nas amostras, pode fornecer dados qualitativos importantes, pela comparação da resposta de amplificação entre diferentes amostras, condições ou tratamentos realizados.



## 5. CONCLUSÕES

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de aplicação de um ensaio biomolecular para determinar a presença e a viabilidade de ovos de *Ascaris* em amostras de lodo doméstico, assim como verificar a acurácia do método convencional para determinação de ovos viáveis deste parasita em lodo, adotado pela Resolução CONAMA N° 375/ 06 (USEPA, 2003). Dessa forma, foram realizados ensaios de recuperação, utilizando-se amostras de lodo anaeróbio e aeróbio, coletados em estações de tratamento de esgoto em Curitiba e inoculados com concentrações conhecidas de ovos viáveis de *Ascaris suum*.

Como resultado, o valor máximo de recuperação dos ovos inoculados de *A. suum* foi 59,8%, para lodo centrifugado anaeróbio, e 25%, para lodo centrifugado aeróbio, aplicando-se o método da USEPA (2003). Os valores obtidos encontram-se abaixo da expectativa, fazendo com que o uso indiscriminado deste método para qualquer matriz de lodo, independente de sua origem e características, fosse um dos pontos de questionamento desta pesquisa. Lodos aeróbios apresentaram as menores porcentagens de recuperação dos ovos inoculados, e valores como 3,5% e 4,7% de acurácia foram obtidos para algumas amostras. Este tipo de lodo, assim como outras matrizes de lodo geradas no Brasil, não tem sua acurácia determinada pela USEPA e a determinação, pelo CONAMA (2006), que este método seja aplicado para o diagnóstico de helmintos em qualquer tipo de lodo e compostos deveria ser revista.

As análises estatísticas realizadas confirmaram a diferença de acurácia do método USEPA (2003) para lodos anaeróbios e aeróbios, evidenciando a falta de universalidade do método. Diferentes concentrações de ovos inoculados e diferentes campanhas de coletas também apresentaram diferença significativa na recuperação dos ovos. Estes resultados não só justificaram, como também evidenciaram a urgência na otimização de um novo método de diagnóstico.

Dentro de um processo de validação, a etapa de desenvolvimento de um método deve abranger o levantamento de todas as informações pertinentes para a adequada estruturação dos ensaios. Nesta pesquisa, ensaios morfológicos, embriogênicos e moleculares do parasita *Ascaris* foram levados a efeito, visando à elaboração da melhor estratégia para determinação dos ovos viáveis destes

organismos. Como resultado, uma grande quantidade de informações acerca da fase embrionária do parasita, pouco estudada na literatura, foi obtida.

Esta pesquisa apresentou evidências da dependência da embriogênese de *A. suum* à concentração de ovos no meio, não descrita antes na literatura. Ovos incubados em menor concentração apresentaram desenvolvimento embrionário mais acelerado do que aqueles em meios contendo maior concentração de ovos. Este comportamento parece estar vinculado a condições limitantes existentes no meio de incubação devido a quantidade de ovos presente, e deve ser investigado mais exhaustivamente em estudos futuros. Também foi possível estabelecer um protocolo para a lise completa dos ovos de *A. suum* por micropérolas de vidro, visando à obtenção do material genético a ser utilizado em ensaios moleculares. Outros métodos de lise, químicos e enzimáticos, foram investigados, entretanto, não apresentaram a mesma resposta obtida pela lise mecânica dos ovos.

O mRNA do gene alvo *alep1*, tanto de amostras padrão, como de lodo de esgoto, foi obtido em quantidade e qualidade adequadas e pôde ser utilizado nos ensaios de RT-qPCR. Todas as amostras apresentaram sinal de amplificação, com exceção de duas amostras de lodo aeróbio, provavelmente devido a perdas durante seu processamento.

A amplificação dos padrões não possibilitou a construção de uma curva de calibração do método baseada no mRNA de *alep1*, devido à proximidade entre os valores de C<sub>q</sub> obtidos. Entretanto, este alvo molecular se mostrou adequado para a identificação de ovos viáveis nas amostras de lodo, dada sua longevidade no interior das células do parasita, diferentemente do que é descrito para mRNA de forma geral na literatura. Esta resposta evidencia a inovação do ensaio desenvolvido pois, até o momento, não há outro método descrito na literatura para determinação da viabilidade de ovos de *Ascaris* em lodo de esgoto com base no RNA mensageiro do parasita.

## **RESPOSTA À HIPÓTESE**

De acordo com os resultados obtidos, a hipótese deve ser aceita. A determinação de ovos viáveis de *Ascaris* em lodo de esgoto doméstico pode ser realizada por RT-qPCR, utilizando o gene *alep1* presente nas células embrionárias do parasita como alvo de amplificação.

## 6. SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DA PESQUISA

Novas abordagens a serem consideradas na continuidade desta pesquisa, incluem:

- continuação do processo de validação do ensaio biológico para determinação de ovos viáveis de *Ascaris* em lodo de esgoto: etapas de caracterização e validação da performance;
- avaliação de novos alvos moleculares para o método de RT-qPCR desenvolvido, visando ao aumento da eficiência dos ensaios em tempo real e à determinação de uma curva de calibração para quantificação dos ovos viáveis do parasita;
- investigação do gene *fert1* como alvo molecular, também eliminado durante o processo de redução cromossômica de *Ascaris*. O gene *fert1* é estrutural e seu mRNA pode estar presente em elevada quantidade antes mesmo da primeira divisão celular do embrião;
- acompanhamento da embriogênese de *A. suum* em outras concentrações de ovos, visando à confirmação da relação existente entre a quantidade de ovos incubada e o tempo de desenvolvimento embrionário do parasita;
- avaliação da acurácia da metodologia USEPA (2003) para outras matrizes de lodo originadas em processo diversos de tratamento de esgotos: tanques sépticos, tratamentos físico-químicos, lagoas anaeróbias e facultativas, lodos ativados convencional e filtros biológicos.

## REFERÊNCIAS

AISSE, M. M. **Sistemas Econômicos de Tratamento de Esgotos Sanitários**. 1. ed. Rio de Janeiro-RJ: ABES, 2000. 192p .

ALLEN, A.V.H.; RIDLEY, D.S. Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites **Journal of Clinical Pathology**, v. 23, p. 545–546, 1970.

ALM, E.W.; STAHL, D. A. Critical factors influencing the recovery and integrity of rRNA extracted from environmental samples: use of an optimized protocol to measure depth-related biomass distribution in fresh water sediments. **Journal of Microbiological Methods** , v.40, p. 153-162, 2000.

ALMEIDA, A.F.; SANTOS, V.M.; TONANI, K.A.A.; TAKAYANAGUI, A.M.M.; SEGURA-MUNOZ, S.I. Adaptation of Ritchie Method for diagnosing Helminthes and Protozoa in samples of sewage silt with chemical substances minimization. **Mundo Saúde**, v. 33, p. 427-432, 2009.

ALONSO, J.L.; AMÓROS, I.; CANIGRAL, I. Development and evaluation of a Real-Time PCR assay for quantification of *Giardia* e *Cryptosporidium* in sewage samples. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v.89, n.4, p. 1203-1211, 2011.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERSW, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment/search tool. **Journal of molecular Biology**. v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

AMUDA, O.S.; DENG, A.; ALADE, A.O.; HUNG, Y-T. Biosolids Engineering and Management. In: WANG, L. K., SHAMMAS, N. K., HUNG, Y. T. **Conversion of sewage sludge to biosolids**. Nova York: Humana Press, 2008, p. 65-115.

ANDERSON, T.J. *Ascaris* infectious in humans from North America: molecular evidence for cross-infection. **Parasitology**, v. 110, p. 215-219, 1995.

ANDERSON, T.J.C. The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. **Trends in Parasitology**, v. 17, p.183-188, 2001.

ANDERSON, T.J.C.; ROMERO-ABAL, M.E.; JAENIKE, J. Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* population: patterns of host affiliation in Guatemala. **Parasitology**, v. 107, p. 319-334, 1993.

ANDREOLI, C.V.; FERREIRA, A.C.; CHERUBINI, C.; TELES, C.R.; CARNEIRO, C.; FERNANDES, F. Higienização do lodo de esgoto. In: ANDREOLI, C.V. (Ed.) Aproveitamento do lodo gerado em estações de tratamento de água e esgotos sanitários, inclusive com a utilização de técnicas consorciadas com resíduos sólidos urbanos, Rede cooperativa de pesquisas- PROSAB, p.87-118, 2001a.

ANDREOLI, C.V.; GARBOSSA, L.H.P.; LUPATINI, G.; PEGORINI, E.S. **Wastewater sludge management: a brazilian approach**. In: Global atlas of excreta, wastewater sludge and biosolids management: moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource, p. 131-146, 2008.

ANDREOLI, C.V.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F. **Lodo de esgotos: tratamento e disposição final**. In: Princípio do tratamento biológico de águas residuárias, v.6. Editora FCO: Belo Horizonte, 2001b. 483 f.

ANSEL, M.; THIBAU, T. M. Value of the specific distinction between *Ascaris lumbricoides* Linné 1758 and *Ascarissuum* Goeze 1782. **International Journal for Parasitology**, v. 3, n.3, p. 317-318, 1973.

APHA-AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standart Methods for the examination of water and wastewater**, ed. 20, Washington: Hardcover, 1998. 1368 p.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Guetting Started Guide** – Standard Curve Experiments. California: Applied Biosystems, 2007. 126 p.

ARENE, F.O. *Ascaris suum*: Influence of embryonation temperature on the viability of the infective larva. **Journal of Thermal Biology**, v. 11, p. 9–15, 1986.

ARIZONO, N.; YOSHIMURA, Y.; TOHZAKA, N.; YAMADA, M., TEGOSHI, T., ONISHI, K., UCHIKAWA, R..Ascariasis in Japan: is pig-derived *Ascaris* infecting humans? **Japan Journal of Infectious Diseases**, v. 63, n. 6, p. 447-448, 2010.

ARTHURSON, V. Proper sanitization os Sewage Sludge: a Critical Issue for a Sustainable Society. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5267-5275, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS- ABNT. **NBR ISO/IEC 17025: Requisitos Gerais para competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração**. Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, 2005.

AUDEMARD, C.; REECE, K.S.; BURRESON, E.M. Real-Time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6611-6618, 2004.

BANEGAS, V.; MORENO, J. L.; MORENO, J. I.; GARCIA, C.; LEON, G.; HERNANDEZ, T. Composting anaerobic and aerobic sewage sludges using two proportions of sawdust. **Waste Management**, v. 27, n.10, p.1317-1327, 2007.

BARÉS, M. E.; NOYOLA, A.; BRAGA, S. M.; AISSE, M. M.; BRAGA, M. C. B. B. Aperfeiçoamento do método para a determinação de ovos de helmintos em lodo de esgoto. In: Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitária y Ambiental, 32, 2010, Punta Cana. **Anais do 32º Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitária y Ambiental**. Punta Cana, República Dominicana, 2010. CD-ROM. 7p.

BARRELA, K.M. **Pesquisa de vírus entéricos humanos em lodo de esgoto originários de duas ETEs do Estado de São Paulo**: Estabelecimento de metodologia para recuperação e detecção viral. Tese (Doutorado em Microbiologia). Universidade de São Paulo, 2008. 59f.

BASUNI, M. I. MUHI, J., OTHMAN, N., VERWEIJ, J. J., AHMAD, M., MISWAN, N., NOORDIN, R. A pentaplex Real-Time Polymerase Chain Reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n.2, p.338-343, 2011.

BEAN, C.L.; BRABANTS, J.J. Lab analyzes *Ascaris* ova recovery rates using revised protocols. **Biosolids Technical Bulletin**, v. 7, p.12–14, 2001.

BERNAL, M.P.; NAVARRO, A. F.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A.; ROIG, A.; CEGARRA, J. Influence of sewage sludge compost stability and maturity on carbon and nitrogen mineralization in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 305-313, 1998.

BITTENCOURT, S. ; SERRAT, B. M. ; AISSE, M. M. ; GOMES, D. Sewage Sludge Usage in Agriculture: a Case Study of its Destination in Curitiba Metropolitan Region. In: X Oficina e Seminário Latino Americano de Digestão Anaeróbia (DAAL), 2011, Ouro Preto. **Anais do X DAAL**, 2011.

BITTENCOURT, S.; ANDREOLI, C.V.; ALCEU MOCHIDA, G.; MARIN DE SOUZA, L. M. K. Uso agrícola de lodo de esgoto, estudo de caso da região Metropolitana de Curitiba. **Revista AIDIS**, v. 2, n.1, p. 1-11, 2009.

BITTENCOURT, S.; ANDREOLI, C.V.; MOCHIDA, G.A.; SOUZA, L.M.K.M.; SERRAT, B.M. Aspectos agrônômicos do uso agrícola de lodo de esgoto - região metropolitana de Curitiba. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica**, v.2, n. 1, 2009.

BITTENCOURT, S.; MONTE SERRAT, B.; AISSE, M.M.; GOMES, D. Sewage sludge usage in agriculture: a case study of its destination in the Curitiba Metropolitan Region, Paraná, Brazil. **Water, Air and Soil Pollution**, 225: 2074, 2014.

BLACK, M.I.; SCARPINO, P.V.; O'DONNELL, C.J.; MEYER, K.B.; JONES, J.V.; KANESHIRO, E.S. Survival rates of parasite eggs in sludge during aerobic and anaerobic digestion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 1138-1143, 1982.

BLAXTER, M.L. Nematoda: genes, genome and the evolution of Parasitism. **Advance in Parasitology**, v. 54, p. 101-195, 2003.

BOISVENUE, R.J. Effects of aeration and temperature *in vitro* and *in vivo* studies on developing and infective eggs of *Ascaris suum*. **Journal of Helminthology Society of Washington**, v. 7, p.51–56, 1990.

BORNEMANN, J. ; TRIPLETT, E.W. Rapid and direct method for extraction of RNA from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p. 1621-1624, 1997.

BOVERI, T. Die Befruchtung und Teilung des eies von *Ascaris megalocephala*. **Zell Studien**, v. 2, p. 1-198, 1887.

BOWMAN, D.D.; LITTLE, M.D.; REIMERS, R.S. Precision and accuracy of an assay for detecting *Ascaris* eggs in various biosolids matrices. **Water Research**, v. 37, p. 2063-2072, 2003.

BRAID, M.D.; DANIELS, L.M.; KITTS, C.L. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 389-393, 2003.

BREWSTER, J.; OLESZKIEWICZ, J.; BUJOCZEK, G.; REIMERS, R. S.; ABU-ORF, M.; BOWMAN, D.; FOGARTY, E. Inactivation of *Ascaris suum* eggs in digested and dewatered biosolids with lime and fly ash at bench scale and full scale. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 2, n.5, p. 395-400, 2003.

BURTSCHER, C.; WUERTZ, S. Evaluation of the use of PCR and Reverse Transcriptase PCR for detection of pathogenic bacteria in biosolids from anaerobic digestors and aerobic composters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.8, p. 4618-4627, 2003.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, n. 4, p. 611-622, 2009.

BUSTIN, S.A. **A-Z of Quantitative PCR**. California: International University Line (IUL), 2004. 882p.

CAPIZZI-BANAS, S.; DELOGE, M.; REMY, M.; SCHWARTZBROD, J. Liming as an advanced treatment for sludge sanitisation: helminth eggs elimination—*Ascaris* eggs as model. **Water Research**, v. 38, n. 14, p. 3251-3258, 2004.

CHASSY, B. M.; GIUFFRIDA, A. (1980). Method for the lysis of Gram-positive, asporogenous bacteria with lysozyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 153-158, 1980.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios**. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v. 5, 2. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2007.

CHERNICHARO, C.A.L.; CASTRO, J.C.S.; ZERBINI, A.M.; GODINHO, V.M. Inactivation of *E. coli* and helminths eggs in aerobic and anaerobic effluents using UV radiation. **Water Science and Technology**, v. 47, n. 9, p. 185-192, 2003.

CHOI, J.; LEE, S. H.; FUKUSHI, K.; YAMAMOTO, K. Comparison of sludge characteristics and PCR- DGGE based microbial diversity of nanofiltration and microfiltration membrane bioreactors. **Chemosphere**, v. 67, n. 8, p. 1543-1550, 2007.

CLEAVINGER, P. J., MCDOWELL, J.W.; BENNETT, K.L. Transcription in nematodes: Early *Ascaris* embryos are transcriptionally active. **Developmental Biology**, v. 133, p. 600-604, 1989.

COFIE, O.; KONE, D.; ROTHENBERGER, S.; MOSER, D.; ZUBRUEGG, C. Co-composting of faecal sludge and organic solid waste for agriculture: Process Dynamics. **Water Research**, v.43, p. 4665-4675, 2009.

CONAMA. - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente. Resolução n. 375, de 29 de Agosto de 2006. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília DF. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>>. 32p. Acesso em: 23/04/2012.

CORRÊA, R.S.; FONSECA, Y.M.F.; CORRÊA, A.S. Produção de biossólido agrícola

por meio da compostagem e vermicompostagem de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, p. 420-426, 2007.

COSTA, J. C.; MESQUITA, D. P.; AMARAL, A. L.; ALVES, M. M.; FERREIRA, E. C. Quantitative image analysis for the characterization of microbial aggregates in biological wastewater treatment: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v.20, n. 9, p. 5887-5912, 2013.

COUPE, S.; SARFATI, C.; HAMANE, S.; DEROUIN, F. Detection of Cryptosporidium and identification to the species level by Nested PCR and restriction fragment polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1017-1023, 2005.

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G.; SCALA, A. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p.121–131, 2004.

CRUZ, L.M.; ALLANSON, M.; KWA B.; AZIZAN, A.; IZURIETA, R. Morphological changes of *Ascaris* spp. eggs during their development outside the host. **Journal of Parasitology**, v. 98, p. 63–68, 2012.

CZECHOWSKI, F.; MARCINKOWSKI, T. Sewage sludge stabilization with calcium hydroxide: Effect on physico-chemical properties and molecular composition. **Water Research**, v. 40, n.9, p. 1895-1905, 2006.

DAVID, E.D.; LINDQUIST, W.D. Determination of the specific gravity of certain helminth eggs using sucrose density gradient centrifugation. **Journal of Parasitology** v. 68, p. 916-919, 1982.

DE MARIA, I.C.; CHIBA, M. K.; COSTA, A.; BERTON, R. S. Sewage sludge application to agricultural land as soil physical conditioner. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 34, n. 3, p. 967 -974, 2010.

DE NOOY, A. E. J.; RORI, V.; MASCI, G.; DENTINI, M.; CRESCENZI, V. Synthesis and preliminary characterisation of charged derivatives and hydrogels from scleroglucan. **Carbohydrate Research**, v. 324, n. 2, p. 116-126, 2000.

De VICTORICA, J.; GALVÁN, M. Preliminary testing of a rapid coupled methodology for quantitation/viability determination of helminth eggs in raw and treated wastewater. **Water Research**, v. 37:1278-1287, 2003.

DMITRYJUK, M.; ŻÓŁTOWSKA, K.; KUBIAK, K.; GŁOWIŃSKA, A. Changes in trehalase activity and trehalose level during *Ascaris suum* (Nematoda) embryogenesis. **Helminthologia**, v. 43, n. 3, p. 130-133, 2006.

DOLD, C. . HOLLAND, C. V. *Ascaris* and ascariasis. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 7, p. 632-637, 2011.

DRYDEN, M.W.; PAYNE, P.A.; RIDLEY, R.; SMITH, V. Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. **Veterinary Therapeutics**, v. 6, p.15-28, 2005.



DUNAEV, T. ALANYA, S.; DURAN, M. Gene expression monitoring for detection and quantification of viable but non culturable pathogens in biosolids. **Proceedings of the Water Environmental Federation**, v.11, p. 1053-1063, 2008.

EDERVEEN, Joke. A practical approach to biological assay validation. **Dutch Ministry of Housing, Spatial Planning and the Environment (VROM), Hoofddorp**, 2010.

ERIKSEN, L.; ANDREASEN, P.; ILSØE, B. Inactivation of *Ascaris suum* eggs during storage in lime treated sewage sludge. **Water research**, v. 30, n. 4, p. 1026-1029, 1996.

ETTER, A.; ABOUTANOS, M.; TOBLER, H.; MÜLLER, F. Eliminated chromatin of *Ascaris* contains a gene that encodes a putative ribosomal protein. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v.88, n.5, p. 1593-1596, 1991.

ETTER, A.; BERNARD, V.; KENZELMANN, M.; TOBLER, H.; MULLER, F. Ribosomal heterogeneity from chromatin diminution in *Ascaris lumbricoides*. **Science**, v. 265, p. 954-956, 1994.

EXCELSIOR SENTINEL. Product information and technical support. Ithaca, New York, 2012.

FAUST, E.C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODEM, V.; PERES, C. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminths in faeces. **Journal of Parasitology**, v. 25, p. 241–262, 1939.

FCFR – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. **Atlas Acadêmico de Parasitologia Humana**. Disponível em: <[http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/ATLAS\\_DE\\_PARASITOLOGIA.htm](http://www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/ATLAS_DE_PARASITOLOGIA.htm)> Acesso em : 25/03/2012.

FERNANDES, S.A.P; BETTIOL, W.; CERRI, C.C.; CAMARGO, P. Sewage sludge effects on gas fluxes at the soil-atmosphere interface, <sup>13</sup>C and on total soil carbon and nitrogen. **Geoderma**, v. 125, p. 49-57, 2005.

FITZGERALD, P.R.; FOX, J.C. **A study of the parasite and free living organisms in sewage from five treatment plants of the MSDGC**. Final Report, MSDGC, 1978.

FONTAINE, M. e GUILLOT, E. Study of 18s rRNA and rDNA stability by real-time RT-PCR in heat inactivated *Cryptosporidium parvum* oocysts. **FEMS Microbiology Letters**, v.226, p. 237-243, 2003.

FORMIGA-CRUZ, M.; HUNDESA, A.; CLEMENTE-CASARES, P.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; ALLARD, A.; GIRONES, R. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. **Journal of Virological Methods** v. 125, p. 111-118, 2005.

GALDOS, M. V.; DE MARIA, I.C.; CAMARGO, O. A. Atributos químicos e produção de milho em um Latossolo Vermelho eutroférico tratado com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.28, p. 569-577, 2004.

GALLAGHER, E. M.; MARGOLIN, A. B. Development of an integrated cell culture

Real-Time RT-PCR assay for detection of reovirus in biosolids. **Journal of Virological Methods**, v. 139, p. 195-202, 2006.

GASPARD, P.; WIART, J.; SCHWARTZBROD, J. A method for assessing the viability of nematode eggs in sludge. **Environmental Technology**, v. 17, p. 415-420, 1996.

GASPARD, P.; SCHWARTZBROD, J. Helminth egg in wastewater: quantification technique. **Water Science and Technology**, v. 31, p. 443-446, 1995.

GASPARD, P.G.; SCHWARTZBROD, J. Parasite contamination (helminth eggs) in sludge treatment plants: definition of a sampling strategy. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 206, p.117-122, 2003.

GASPARD, P.G.; WIART, J.; SCHWARTZBROD, J. Experimental study of the helminth eggs adhesion (*Ascaris suum*): analysis of the environmental implications. **Revue des Sciences de l'Eau**, v. 7, p. 367-376, 1994.

GEENEN, P. L., BRESCIANI, J.; BOES, J.; PEDERSEN, A.; ERIKSEN, L., FAGERHOLM, H. P., NANSEN, P. The morphogenesis of *Ascaris suum* to the infective third-stage larvae within the egg. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n.4, p. 616-622, 1999.

GHIgliETTI, R.; GENCHI, C.; DI MATTEO, L.; CALCATERRA, E.; COLOMBI, A. Survival of *Ascaris suum* eggs in ammonia-treated wastewater sludges. **Bioresource Technology**, v.59, p. 195-198, 1997.

GIBSON, U.E.; HEID, C.A.; WILLIAMS, P.M. A novel method for Real-Time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, v.6, p. 995-1001, 1996.

GILBERT, S.F. *Developmental Biology*. 9 ed. Sinauer Associates, 2010. 711 p.

GODAY, C.; GONZALEZ-GARCIA, J. M.; ESTEBAN, M. R.; GIOVINAZZO, G.; PIMPINELLI, S. Kinetochores and chromatin diminution in early embryos of *Parascaris univalens*. **Journal of Cell Biology**, v. 118, n. 23-32, 1992.

GOLDSTEIN, P.; STRAUS, N.A. Molecular characterization of *Ascaris suum* DNA and chromatin diminution. **Experimental Cell Research**, v. 116, n.2, p. 462-466, 1978.

GONÇALVES, R.F.; LUDUVICE, M.; VON SPERLING, M. Remoção da umidade de lodos de esgoto. In: ANDREOLI, C.V.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F. **Lodos de esgoto: tratamento e disposição final**. Belo Horizonte: DESA-UFGM/ SANEPAR, p.159-259, 2001.

GOSLING, M.; GONÇALVES, C.A. Modelagem por equações estruturais: conceitos e aplicações. **Revista de Administração FACES**, v.2, n.2, p. 83-95, 2003.

GREEN, J. Peer reviewed: a practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 9, p. 305A-309A, 1996.

GUZMAN, C.; JOFRE, J.; MONTEMAYOR, M.; LUCENA, F. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2420-2429, 2007.

HARTENSTEIN, R. Sludge : decomposition and stabilization. **Science**, v. 212, n. 4496, p. 743-749, 1981.

HEID, C.A. ; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real-time quantitative PCR. **Genome Research**, v.6, p. 986-994, 1996.

HERNÁNDEZ, T.; MORENO, J. I.; COSTA, F. Influence of sewage sludge application on crop yields and heavy metal availability. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 37, n. 2, p. 201-210, 1991.

HIGUCHI R. ; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis : Real-Time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (N.Y.)**, v.11, p. 1026-1030, 1993.

HURT, R. A.; QIU, X.; WU, L.; ROH, Y.; PALUMBO, A. V.; TIEDJE, J. M.; ZHOU, J. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soil and sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4495-4503, 2001.

HUYARD, A.; FERRAN, B.; AUDIC, J.M. The two phase anaerobic digestion process: sludge stabilization and pathogens reduction. **Water Science and Technology**, v. 42, p.41-47, 2000.

ISHIWATA, K.;SHINOHARA, A.; YAGI, K.; HORII, Y.; TSUCHIYA, K.; NAWA, Y. Identification of tissue embedded ascarid larval by ribosomal DNA sequencing. **Parasitology Research**, v. 92, p. 50-52, 2004.

JASKOSKI, B.J. A comparative study of detergent effects on ascarid development. **The American Midland Naturalist Journal**, v. 52, p.142-148, 1954.

JENTSCH, S.; TOBLER, H.; MÜLLER, F. New telomere formation during the process of chromatin diminution in *Ascaris suum*. **International Journal of Developmental Biology** v. 46, p. 143-148, 2002.

JIMENEZ , B. ; MAYA, C.; GALVÁN, M. Helminth ova control in wastewater and sludge for advanced and conventional sanitation. **Water Science and Technology**, v. 56, n. 5, p. 43-51, 2007.

JIMÉNEZ, B. Helminth ova control in sludge: A review. **Water Science & Technology**, v. 56, n. 9, p. 147-155, 2007.

JIMENEZ, B., E.; MAYA, C. **Communication Current Research and Educational Topic and Trends in Applied Microbiology**. MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.), v. 1, p. 60-71, 2007.

JIMENEZ, B.; BARRIOS, J.A.; MENDEZ, J.M.; DIAZ, J. Sustainable sludge management in developing countries. **Water Science and Technology**, v.49, n. 10, p. 251-258, 2004.

JIN, M.; ZHAO, Z. G.; QIU, Z. G.; WANG, J. F.; CHEN, Z. L.; SHEN, Z. Q.; LI, J. W. Rapid Method to extract high-quality RNA from activated sludge. **Huan Jing Ke Xue**, v.31, n.1, p. 260-265, 2010.

JOHNSON, P.W.; DIXON, R.; ROSS, A.D. An in-vitro test for assessing the viability of *Ascaris suum* eggs exposed to various sewage treatment processes. **International Journal of Parasitology**, v. 28: 627–633, 1998.

KAUENER, C.; STIENER, T. Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large-volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1743-1749, 1998.

KHOUJA, L.B.; CAMA, V.; XIAO, L. Parasitic contamination in wastewater and sludge samples in Tunisia using three different detection techniques. **Parasitology Research**, v. 107, p. 109-116, 2010.

KIM, M-K.; Pyo, K. H.; Hwang, Y. S.; Park, K. H.; Hwang, I. G.; Chai, J. Y. Shin, E. H. Effect of temperature on the embryonation of *Ascaris suum* eggs in environmental chamber. **Korean Journal of Parasitology**, v. 50, n. 3, p. 239-242, 2012.

KONIECZKA, P.; NAMIÉŚNIK, J. **Quality assurance and quality control in the analytical chemical laboratory: a practical approach**. CRC Press, New York, 2009.

KRAMME, S.; NISSEN, N.; SOBLIK, H.; ERTTMANN, K.; TANNICH, E.; FLEISCHER, B.; BRATTIG, N. Novel Real-Time PCR for the universal detection of *Strongyloides* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 454-458, 2011.

LELES, D.; GARDNER, S. L.; REINHARD, K.; IÑIGUEZ, A.; ARAUJO, A. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? **Parasite and Vectors**, v. 5, p. 42, 2012.

LELES, D. **Paleogenética e Paleoepidemiologia de *Ascaris* sp.(Linnaeus, 1758) e *Trichuris* sp.(Roederer, 1761)**. 213 f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Saúde Pública), Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

LETTINGA, G. A. F. M.; VAN VELSEN, A. F. M.; HOBMA, S. W., DE ZEEUW, W.; KLAPWIJK, A. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n.4, p. 699-734, 1980.

LETTINGA, G.; VINKEN, J. N. Feasibility of the upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process for the treatment of low-strength wastes. In: **Proceedings of the 35th Industrial Waste Conference, May 13-15 1980, at Purdue University, Lafayette, Indiana, USA** (pp. 625-634), 1980.

LEWIN, B. **Genes IX**, 9 ed. Jones e Bartlett Publishers, 2007. 892p.

LEWIS, D. L.; GATTIE, D.K. Pathogen risks from applying sewage sludge to land. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 13, 2002.

LIVAK, K.J. ; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOGE, F.N.; THOMPSON, D. E.; CALL, D.R. PCR detection of specific pathogens in water: a risk based analysis. **Environmental and Science Technology**, v.36, p. 2754-

2759, 2002.

LORD, W.D.; BULLOCK, W.L. Swine *Ascaris* in humans. **New England Journal of Medicine**, v. 306, p. 1113, 1982.

LOREILLE, O.; ROUMAT, E.; VERNEAU, O.; BOUCHET, F.; HÄNNI, C. Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. **International Journal for Parasitology**, v.31, n.10, p. 1101-1106, 2001.

LU, Q.; HE, Z.L.; STOFFELLA, P.J. Land application of biosolids in the USA: a review. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2012, 11p., 2012.

MALICK, J. ; MONTUSIWICZ, A.; BIEGANOWSKI, A. Improvement of counting helminth eggs with internal standart. **Water Research**, v. 35, p. 2333-2335, 2001.

MANDELL, G.L.; BENNET, J.E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. 6. Ed. Philadelphia: Elsevier, 2005.

MARTIN LAURENT, F.; PHILIPPOT, L.; HALLET, S.; CHAUSSOD, R.; GERMON, J. C.; SOULAS, G.; CATROUX, G. DNA extraction from soils. Old Bias for new microbial diversity analysis methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2354-2359, 2001.

MASSARA, C. L.; FERREIRA, R. S.; DE ANDRADE, L. D.; GUERRA, H. L.; DOS SANTOS CARVALHO, O. Atividade de detergentes e desinfetantes sobre a evolução dos ovos de *Ascaris lumbricoides*. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 335-340, 2003.

MAUNG, M. The occurrence of the second moult of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. **International Journal for Parasitology**, v. 8, n.5, p. 371-378, 1978.

MAYA, C.; ORTIZ, M.; JIMENEZ, B. Viability of *Ascaris* and other helminth genera non larval eggs in different conditions of temperature, lime (pH) and humidity. **Water Science and Technology**, v. 62, n.11, p. 2616-2624, 2010.

MAYA, C.; TORNER-MORALES, F.J.; LUCARIO, E. S.; HERNÁNDEZ, E.; JIMÉNEZ, B. Viability of six species of larval and non-larval helminth eggs for different conditions of temperature, pH and dryness. **Water research**, v. 46, p. 4770-4782, 2012.

MCKILLIP, J.L.; JAYKUS, L.A.; DRAKE, M. rRNA stability in heat killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4264-4269, 1998.

MCPMAHON, K.D; YILMAZ, S.; HE, S.; GALL, D. L.; JENKINS, D.; KEASLING, J. D. Polyphosphate kinase genes from full-scale activated sludge plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.77, p. 167-173, 2007.

MELO, W. J.; MARQUES, M.O. Potencial do lodo de esgoto como fonte de nutrientes para as plantas. In: BETTIOL, W. e CAMARGO, O.A., Eds. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2000. p.109-141.

MEYER, K.B.; MILLER, K.D.; KANESHIRO, E.S. Recovery of *Ascaris* eggs from sludge. **Journal of Parasitology**, v. 64, p. 380-383, 1978

MONPOEHO, S.; MAUL, A.; BONNIN, C.; PATRIA, L.; RANARIJAONA, S.; BILLAUDEL, S.; FERRE, V. Clearance of human-pathogenic viruses from sludge: study of four stabilization process by Real-Time Reverse Transcription-PCR and cell culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.9, p. 5434-5440, 2004.

MOODLEY, P.; ARCHER, C.; HAWKSWORTH, D.; LEIBACH, L. **Standards methods for the recovery and enumeration of helminth ova in wastewater, sludge, compost and urine-diversion waste in South Africa**. WRC Report TT322/08, 2008.

MORITZ, K.B.; ROTH, G.E. Complexity of germline and somatic DNA in *Ascaris*. **Nature**, v. 259, p. 55-57, 1976.

MÜLLER, F.; BERNARD, V.; TOBLER, H. Chromatin diminution in nematodes. **Bioassays**, v. 18, p. 133-138, 1996.

MÜLLER, F.; WICKY, C.; SPICHER, A.; TOBLER, H. New telomere formation after developmentally regulated chromosomal breakage during the process of chromatin diminution in *Ascaris lumbricoides*. **Cell**, v. 67, p. 815-822, 1991.

MULLER, F.; TOBLER, H. Chromatin diminution in the parasitic nematodes *Ascaris suum* e *Parascaris univalens*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p.391-399, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Biosolids Applied to Land: Advancing Standards and Practices**. The National Academies Press, Washington, DC, 2002.

NAVARRO, Z.; JIMÉNEZ B.; LUCARIO, S.; CIFUENTES, E. Application of helminth ova infection dose curve to estimate the risks associated with biosolids application on soil. **Journal of Water and Health**, v. 7, n. 1, p.31-44, 2009.

NEJSUM, P.; PARKER, E. D., FRYDENBERG, J., ROEPSTORFF, A., BOES, J., HAQUE, R.; SØRENSEN, U. B. S. Ascariasis is a zoonosis in Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p. 1142-1148, 2005.

NELSON, K.L.; DARBY, J.L. Inactivation of viable *Ascaris* eggs by reagents during enumeration. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p. 5453–5459, 2001.

O'DONNELL, C.J.; MEYER, K.B.; JONES, J.V.; BENTON, T.; KANESHIRO, E.S.; NICHOLS, J.S.; SCHAEFER 3rd, F.W. Survival of parasite eggs upon storage in sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.618, 1984.

OIE - THE WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/1.01.05\\_VALIDATION.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf). Acessado em: 25/11/2014.

OKSANEN, A.; ERIKSEN, L.; ROEPSTORFF, A.; ILSØE, B.; NANSEN, P.; LIND, P. Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs: a comparison of eggs collected

from worm uteri with eggs isolated from pig faeces. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 31, p. 393–398, 1990.

OLIVER, I.W.; MCLAUGHLIN, M.J. ; MERRINGTON, G. Temporal trends of total and potentially available element concentrations in sewage sludge: a comparison of biosolid surveys conducted 18 years apart. **Science of Total Environment**, n.337 (1-3), p.139-145, 2005.

PARKER, G. A; CHUBB, J. C.; ROBERTS, G. N.; MICHAUD, M.; MILINSKI, M. Optimal growth strategies of larval helminthes in their intermediated hosts. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 16, n.1, p. 47-54, 2003.

PARSEKIAN, M. P. S.; PIRES, E. C. Monitoramento e controle do crescimento excessivo de bactérias filamentosas em sistema anaeróbio/aeróbio de tratamento de esgoto doméstico. In: XXVIII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais...Cancun, México**, 2002.

PEARSON, R.D. An update on the geohelminthes: *Ascaris lumbricoides*, hookworm, *Trichuris trichiura* and *Strongyloides stercoralis*. **Current Infectious Diseases Report**, v. 4, p.59-64, 2002.

PECSON, B. M.; BARRIOS, J. A.; JOHNSON, D. R.; NELSON, K. L. A Real-Time PCR method for quantifying viable *Ascaris* eggs using the first internally- transcribed spacer region of rDNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.12, p. 7864-7872, 2006.

PENG, W.; ANDERSON, T. J. C.; ZHOU, X., KENNEDY, M. W. Genetic variation in sympatric *Ascaris* populations from human and pigs in China. **Parasitology**, v. 117, p. 355-361, 1998.

PENG, W.; YUAN, K.; ZHOU, X.; HU, M.; ABS, E. O.; YOUSSEF, G.; GASSER, R. B. Molecular epidemiological investigation of *Ascaris* genotypes in China, based on single strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2308-2315, 2003.

PENG, W.; YUAN, K.; HU, M.; ZHOU, X.; GASSER, R. B. Mutation scanning-coupled analysis of haplotypic variability in mitochondrial DNA regions reveals low gene flow between human and porcine *Ascaris* in endemic regions of China. **Electrophoresis**, v.26, p. 4317-4326, 2005.

PERRY, R. N. Desiccation survival of parasitic nematodes. **Parasitology**, v. 119, p. 519-530, 1999.

PERRY, R.N. Dormancy and hatching of nematode eggs. **Parasitology Today**, v. 5, p. 377-383, 1989.

PINHATI, F.R. **Caracterização molecular da população microbiana do lodo de refinaria de petróleo por PCR-DGGE e RAPD**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

PITERINA, A.V. BARTLETT, J.; PEMBROKE, T. J. Evaluation of the removal of indicator bacteria from domestic sludge processed by Autothermal Thermophilic Aerobic

Digestion (ATAD). **International Journal of Environmental Research on Public Health**, v. 7, n. 9, p. 3422-3441, 2010.

PORCHER, C. MALINGE, M. C.; PICAT, C.; GRANDCHAMP, B. A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer. **Biotechniques**, v.13, p. 106-114, 1992.

POULSEN, T.J.; HANSEN, J.A. Strategic environmental assessment of alternative sewage sludge management scenarios. **Waste Management and Research**, v. 21, p. 19-28, 2003.

POURCHER, A.M.; MORAND, P., PICARD-BONNAUD, F.; BILLAUDEL, S.; MONPOEHO, S.; FEDERIGHI, M.; MOGUEDET, G. Decrease of enteric microorganisms from rural sewage sludge during their composting in straw mixture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 528-539, 2005.

QUEIPO-ORTUNO, M.I.; COLMENERO, J. D. D.; MACIAS, M.; BRAVO, M. J.; MORATA, P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of imunoglobulin G as a inhibitor in real time PCR for serum samples from patients with brucellosis. **Clinical Vaccinology and Immunology**, v. 15, p. 293-296, 2008.

QUILÈS, F.; BALANDIER, J. Y.; CAPIZZI-BANAS, S. In situ characterisation of a microorganism surface by Raman microspectroscopy: the shell of *Ascaris* eggs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 2, p. 249-255, 2006.

QUINTANA, N.R.G. Análise econômica da aplicação de bio sólido na agricultura. 133 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2006.

QVARNSTROM, Y.; VISVESVARA, G. S.; SRIRAM, R.; DA SILVA, A. J. Multiplex Real-Time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp. *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.10, p. 3589-3595, 2006.

REILLY, M. The case against land application of sewage sludge pathogens. **Canadian Journal of Infectious Diseases**, v.12, n.4, p. 205-207, 2001.

REIMERS, R.S.; LITTLE, M.D.; ENGLANDE, A.J., LEFTWICH, D.B.; BOWMAN, D.B.; WILKINSON, R.F. **Parasites in southern sludges and disinfection by standard sludge treatment**. EPA 600/52-81-166 NTIS Report P.B.82-1023, 1981.

REIMERS, R.S.; LITTLE, M.D.; ENGLANDE, A.J.; McDONELL, D.B.; BOWMAN, D.B.; HUGHES, J.M. **Investigation of parasites in sludges and disinfection techniques**. EPA 1600/51-85/022 NTIS Report PB 86-133407, 1986.

REY, L. **Parasitologia: parasitas e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**, 4. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. 883p.

RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNIKOVAS, C. K.; CORRÊA, A. A.; SOUZA, D. S. M.; BARARDI, C. R. M. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 6, 1979-1987, 2010.



RIMHANEN-FINNE, R.; RONKAINEN, P.; HÄNNINEM, M.L. Simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* in sewage sludge by IC-PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 1030-1035, 2001.

ROBBINS, D.; STRANDE, L.; DOCZI, J. Sludge management in developing countries: experiences from the Philippines. **Water** **21**, v. 14, p. 22-25, 2012.

ROH, C.; VILLATTE, F.; KIM, B. G.; SCHMID, R. D. Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.134, p. 97-112, 2006.

ROSA, B.A.; JASMER, D. P.; MITREVA, M. Genome-wide tissue-specific gene expression, co-expression and regulation of co-expressed genes in adult nematode *Ascaris suum*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n.2, p. e2678, 2014.

RUBIO-LOZA, L.A.; NOYOLA, A. Two-fase (acidogenic- methanogenic) anaerobic thermophilic/ mesophilic digestion system for producing Class A biossolids from municipal sludge. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 576- 585, 2010.

RUDE, R.A.; PEELER, J.T.; RISTY, N.G. Comparison of diethyl ether and ethyl acetate as extracting agents for recovery of *Ascaris* spp. and *Trichuris* spp. eggs. **Journal of the Association of Official Analytic Chemists**, v. 70, p.1000–1002, 1987.

SAIKI, K.K. Enzymatic amplification of Beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnoses of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p.1350-1354, 1985.

SALMIATI, M.R.S.; UJANG, Z.; AZMAN, S. Potential of sewage sludge as soil amendment. 2nd International Conference on Environment and Industrial Innovation. **Proceedings...** Singapore, v. 35, p. 66-70, 2012.

SANEPAR - Companhia de Saneamento do Paraná. **Manual de Projetos de Saneamento**. Módulo 11.2. ROSS, B.Z.L. *et al.* (coord.), 11p., 2011.

SANO, D.; FUKUSHI, K.; YOSHIDA, Y.; OMURA, T. Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR. **Water Research**, v.37, p. 3490-3498, 2003.

SATCHWELL, M.G. An adaptation of concentration techniques for the enumeration of parasitic helminth eggs from sewage sludge. **Water Research**, v.20, p. 813-816, 1986.

SCHRIEWER, A.; WEHLMANN, A.; WUERTZ, S. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. **Journal of Microbiological Methods**, v.85, n.1. p. 16-21, 2011.

SEGHEZZO, L.; ZEEMAN, G.; VAN LIER, J. B.; HAMELERS, H. V. M.; LETTINGA, G. A review: the anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. **BioresourceTechnology**, v.65, n.3, p. 175-190, 1998.

SHABIR, G. A.; JOHN LOUGH M.; ARAIN, S.A.; BRADSHAW, T.K. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. **Journal of Liquid**

**Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 3, p. 311-333, 2007.

SHENG, G-P; YU, H-Q. Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy. **Water Research**, v. 40, n. 6, p. 1233-1239, 2006.

SHIEH, Y.; BARIC, R.S.; SOBSEY, M.D. Detection of low levels of enteric viruses in metropolitan and airplane sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4401-4407, 1997.

SIDHU, J.P.S; TOZE, S.G. Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. **Environmental International**, v. 35, p.187-201, 2009.

SINGH, R.P.; AGRAWAI, M. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. **Waste Management**, v.38, p. 347-358, 2008.

SMITH, C. Induced larval motility: a possible viability test for embryonated *Ascaris lumbricoides* ova. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 760, 1991.

SOMMERS, L. E. Chemical composition of sewage sludges and analysis of their potential use as fertilizers. **Journal of Environmental Quality**,v.6, n.2, p. 225-232, 1997.

SPICHER, A.; ETTER, A.; BERNARD, V.; TOBLER, H.; MÜLLER, F. Extremely stable transcripts may compensate for the elimination of the gene fert-1 from all *Ascaris lumbricoides* somatic cells. **Developmental Biology**, v.164, p. 72-86, 1994.

SPICHER, A.; ETTER, A.; TOBLER, H.; MUELLER, F. Transcriptional activity in *Ascaris* embryo begins just after fertilization. **Worm Breeders Gazette**, v. 12, n. 3, p. 76, 1992.

SPINOSA, L.; AYOL, A.; BAUDEZ, J.C.; CANZIANI, R.; JENICEK, P.; LEONARD, A.; RULKENS, W.; XU, g.; van DIJK, L. Sustainable and innovative solutions for sewage sludge management. **Water**, v. 3, p. 702-717, 2011.

SPSS Inc. **SPSS® 13.0 Command Syntax Reference**. Chicago, 2004.

STEER, A.G.; NELL, J.H.; WIECHERS, S.G. A modification of the Allen and Ridley technique for the recovery of *Ascaris lumbricoides* ova from municipal compost. **Water Research**, v. 8, n. 851–853, 1974.

STINEAR, T.; MATUSAN, A.; HINES, K.; SANDERY, M. Detection of a single viable *Cryptosporidium parvum* oocyst in environmental water concentrates by reverse transcription.-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3385-3390, 1996.

STOVER, R.C.; SOMMERS, L.E.; SILVEIRA, D.J. Evaluation of metal in wastewater sludge. **Journal of Water Pollution**, v. 48, n. 9, p. 2165-2175, 1976.

STRAUB, T. M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. Hazards from pathogenic microorganisms in land disposed sewage sludge. **Reviews of Environmental**

**Contamination and Toxicology**, v.132, p. 55-91, 1993.

STRAUB, T.M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. Comparison of PCR and cell culture for detection of enteroviruses in sludge-amended field soil and determination of their transport. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.5, p. 2066-2068, 1995.

TAMANINI, C. R.; MOTTA, A. C. V.; ANDREOLI, C. V.; DOETZER, B. H. Land reclamation recovery with the sewage sludge use. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, p. 843-855, 2008.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

THOMAZ-SOCCOL, V.; PAULINO, R.C.; CASTRO, E.A. Metodologia para análise parasitológica em lodo de esgoto. In: ANDREOLI, C.V. **Manual de métodos para análises microbiológicas e parasitológicas em reciclagem agrícola de lodo de esgoto**. 2 ed. Curitiba: Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR), p. 27-41, 2000.

TOBLER, H. The differentiation of germ and somatic cell line in nematodes germ-line soma differentiation. **Problems in cell differentiation**, v.13, p. 1-69, 1986.

TOZE, S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. **Water Research**, v. 33, n.17, p. 3545-3556,1999.

TSAI, Y. L.; TRAN, B.; SANGERMANO, L. R.; PALMER, C. J. Detection of poliovirus hepatitis A virus and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.7, p. 2400-2407, 1994.

TSAI, Y.; OLSON, B.H. Detection of low number of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 754-757, 1992.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge**. EPA/625/R-92/013, 1992.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Environmental Regulations and Technology- Control of Pathogens and vector attraction in Sewage Sludge (including Domestic Septage)**. Washington, 2003.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of Real-Time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

VAN ZONEN, P.; HOOGERBRUGGE, R.; GORT, S. M., van de WIEL, H. J., VAN'T KLOOSTER, H. A. Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9, 584-593, 1999.

VANGUILDER, H.D.; VRANA, K.E.; FREEMAN, W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, v.44, p. 619-626, 2008.

VASSEUR, L.; LAFRANCE, L.; ANSSEAU, C.; RENAUD, D.; MORIN, D.; AUDET, T. Advisory committee: a powerful tool for helping decision makers in environmental issues. **Environmental Management**, v.21, n. 3, p. 359-365, 1997.

VIAU, E.; PECCIA, J. Evaluation of the enterococci indicator in biosolids using cultured based and quantitative PCR assays. **Water Research**, v.43, p. 4878-4887, 2009.

VON SPERLING, M.; FREIRE, V. H.; DE LEMOS CHERNICHARO, C. A. Performance evaluation of a UASB-activated sludge system treating municipal wastewater. **Water Science & Technology**, v. 43, n. 11, p. 323-328, 2001.

VON SPERLING, M.; GONÇALVES, R.F. Lodo de esgotos: características e produção. In: ANDREOLI, C.V.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F. **Lodos de esgoto: tratamento e disposição final**. Belo Horizonte: DESA-UFMG/ SANEPAR, 2001. p. 17-69

WAKELIN, D. Helminths: Pathogenesis and Defenses. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**, 4 ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

WANG, J.; ZHAO, Q. Microbial community analysis on oxic-settling anaerobic process by using PCR-DGGE assay. **Advanced Materials Research**, v 255-260, p. 2934-2939, 2011.

WANG, M.Y.; OLSON, B.H.; CHANG, J.S. Improving PCR and qPCR detection of hydrogenase A (hydA) associated with *Clostridium* in pure cultures and environmental sludges using bovine serum albumin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.77, p. 645-656, 2007.

WÉRY, N.; LHOUTELLIER, C.; DUCRAY, F., DELGENÈS, J. P., & GODON, J. J. Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. **Water Research**, v. 42, p.53-62, 2008.

WHARTON, D.A. The production and functional morphology of helminth egg-shells. **Parasitology**, v. 86, p. 85-97, 1983.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for the safe use of Wastewater, Excreta and Greywater in Agriculture and Aquaculture**. Vol. 1, 2, 3, 4. World Health Organization, ed. Paris, France, 2006.

WILLIAMS, T. M.; UNZ, R. F. Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 273-282, 1985.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3741-3751, 1997.

WOELKERLING, W.J.; KOWAL, R.R.; GOUGH, S.B. Sedgwick-rafter cell counts: a procedural analysis. **Hydrobiologia**, v. 48, p.95-10, 1976.

WONG, K.; ONAN, B. M.; XAGORARAKI, I. Quantification of enteric viruses, pathogen

indicators and *Salmonella* bacteria in class B anaerobically digested biosolids by culture and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n.19, p. 6441-6448, 2010.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 624-632, 1999.

YANKO, W.A. **Occurrence of Pathogens in Distribution and Marketing Municipal Sludges**. EPA-600/1-87-014. National Technical Information Service, Springfield, Virginia, 1987.

YANKO, W.A. Occurrence of pathogens in distribution and marketing municipal sludges. In: **Environmental regulation and Technology: Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge**. Rapport U.S.EPA, Washington, 1992.

YARON, S.; MATTEWS K.R. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* o157:H7: investigation of specific target gene. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 633-640, 2002.

YU, Z.; MOHN, W.W. Killing two birds with one stone: simultaneous extraction of DNA and RNA from activated sludge biomass. **Canadian Journal of Microbiology**, v.15, n.3, p.269-272, 1999.

ZHANG, X. Study on composting of sewage sludge with matured compost. In: 5<sup>th</sup> International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Wuhan, China. **Proceedings...** p. 1-4, 2011.

ZHOU, B.; LI, F.; LIANG, J. The use of methylene blue–eosin–borax stain in determining the viability of *Ascaris* ova. **Journal of Parasitology and Parasitic Diseases**, v. 3, p.48–9, 1985.

ZHOU, J. ; BRUINS, M.A.; TIEDJE. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 316-322, 1995.

ZHU, X.; CHILTON, N. B., JACOBS; D. E., BOES J., GASSER, R. B. Characterization of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 469-478, 1999.

ZIPPER, C.; BOLLIGER, C.; FLEISCHMANN, T.; SUTER, M. J. F.; ANGST, W., MÜLLER, M. D.; KOHLER, H. P. E. Fate of the herbicides mecoprop, dichlorprop, and 2, 4-D in aerobic and anaerobic sewage sludge as determined by laboratory batch studies and enantiomer-specific analysis. **Biodegradation**, v. 10, n.4, p. 271-278, 1999.

ANEXO A – METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE OVOS VIÁVEIS DE  
HELMINTOS – U. S. EPA (2003)

## Appendix I

### Test Method for Detecting, Enumerating, and Determining the Viability of *Ascaris* Ova in Sludge

#### 1.0 Scope

1.1 This test method describes the detection, enumeration, and determination of viability of *Ascaris* ova in water, wastewater, sludge, and compost. These pathogenic intestinal helminths occur in domestic animals and humans. The environment may become contaminated through direct deposit of human or animal feces or through sewage and wastewater discharges to receiving waters. Ingestion of water containing infective *Ascaris* ova may cause disease.

1.2 This test method is for wastewater, sludge, and compost. It is the user's responsibility to ensure the validity of this test method for untested matrices.

1.3 This standard does not purport to address all of the safety problems, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use. For specific hazard statements, see section 9.

#### 2.0 Referenced Documents

##### 2.1 ASTM Standards:

- ° D 1129 Terminology Relating to Water<sup>1</sup>
- ° D 1193 Specification for Reagent Water<sup>2</sup>
- ° D 2777 Practice for Determination of Precision and Bias of Applicable Methods of committee D-19 on Water<sup>3</sup>

#### 3.0 Terminology

(Definitions and Descriptions of Terms must be approved by the Definitions Advisor.)

3.1 **Definitions** - For definitions of terms used in this test method, refer to Terminology D 1129.

#### 3.2 Descriptions of Terms Specific to This Standard:

3.2.1 The normal nematode life cycle consists of the egg, 4 larval stages and an adult. The larvae are similar in appearance to the adults; that is, they are typically worm-like in appearance.

3.2.2 Molting (*ecdysis*) of the outer layer (*cuticle*) takes place after each larval stage. Molting consists of 2 distinct processes, the deposition of the new cuticle and the shedding of the old one or exsheathment. The cuticle appears to be produced continuously, even throughout adult life.

3.2.3 A molted cuticle that still encapsulates a larva is called a *sheath*.

3.2.4 Ascarid egg shells are commonly comprised of layers. The outer tanned, bumpy layer is referred to as the *mammillated* layer and is useful in identifying *Ascaris* eggs. The mammillated layer is sometimes absent. Eggs that do not possess the mammillated layer are referred to as *decorticated* eggs.

3.2.5 A potentially infective *Ascaris* egg contains a third stage larva<sup>4</sup> encased in the sheaths of the first and second larval stages.

#### 4.0 Summary of Test Method

4.1 This method is used to concentrate pathogenic *Ascaris* ova from wastewater, sludge, and compost. Samples are processed by blending with buffered water containing a surfactant. The blend is screened to remove large particulates. The solids in the screened portion are allowed to settle out and the supernatant is decanted. The sediment is subjected to density gradient centrifugation using magnesium sulfate (specific gravity 1.20). This flotation procedure yields a layer likely

<sup>1</sup>Annual Book of ASTM Standards, Vol 11.01.

<sup>2</sup>Annual Book of ASTM Standards, Vol 11.01.

<sup>3</sup>Annual Book of ASTM Standards, Vol 11.01.

<sup>4</sup>P.L. Geenen, J. Bresciani, J. Boes, A. Pedersen, L. Eriksen, H.P. Fagerholm, and P. Nansen (1999) The morphogenesis of *Ascaris suum* to the infective third-stage larvae within the egg, *J. Parasitology* 85(4):616-622.

to contain *Ascaris* and some other parasitic ova, if present, in the sample. Small particulates are removed by a second screening on a small mesh size screen.<sup>5</sup> The resulting concentrate is incubated at 26EC until control *Ascaris* eggs are fully embryonated. The concentrate is then microscopically examined for the categories of *Ascaris* ova on a Sedgwick-Rafter counting chamber.

## 5.0 Significance and Use

**5.1** This test method is useful for providing a quantitative indication of the level of *Ascaris* ova contamination of wastewater, sludge, and compost.

**5.2** This test method will not identify the species of *Ascaris* detected nor the host of origin.

**5.3** This method may be useful in evaluating the effectiveness of treatment.

## 6.0 Interferences

**6.1** Freezing of samples will interfere with the buoyant density of *Ascaris* ova and decrease the recovery of ova.

## 7.0 Apparatus

**7.1** A good light microscope equipped with brightfield, and preferably with phase contrast and/or differential contrast optics including objectives ranging in power from 10X to 45X.

**7.2** Sedgwick-Rafter cell.

**7.3** Pyrex beakers, 2 L. Coat with organosilane.

**7.4** Erlenmeyer flask, 500 mL. Coat with organosilane.

**7.4** A centrifuge that can sustain forces of at least 660 X G with the rotors listed below.

**7.4.1** A swinging bucket rotor to hold 100 or 250 ml centrifuge glass or plastic conical bottles.

**7.4.2** A swinging bucket rotor to hold 15 ml conical glass or plastic centrifuge tubes.

**7.5** Tyler sieves.

**7.5.1** 20 or 50 mesh.

**7.5.2** 400 mesh, stainless steel, 5 inch in diameter.

**7.5.3** A large plastic funnel to support the sieve. Coat with organosilane.

**7.6** Teflon spatula.

**7.7** Incubator set at 26EC.

**7.8** Large test tube rack to accommodate 100 or 250 mL centrifuge bottles.

**7.9** Small test tube rack to accommodate 15 mL conical centrifuge tubes.

**7.10** Centrifuge bottles, 100 or 250 mL. Coat with organosilane.

**7.11** Conical centrifuge tubes, 15 mL. Coat with organosilane.

**7.12** Pasteur pipettes. Coat with organosilane.

**7.13** Vacuum aspiration apparatus.

**7.13.1** Vacuum source.

**7.13.2** Vacuum flask, 2 L or larger.

**7.13.3** Stopper to fit vacuum flask, fitted with a glass or metal tubing as a connector for 1/4 inch tygon tubing.

**7.14** Spray bottles (16 fl oz.) (2).

**7.14.1** Label one "Water".

**7.14.2** Label one "1% 7X".

## 8.0 Reagents and Materials

**8.1 Purity of Reagents** — Reagent grade chemicals shall be used in all tests. Unless otherwise indicated, it is intended that all reagents shall conform to the specifications of the Committee on Analytical Reagents of the American Chemical Society<sup>6</sup>. Other grades may be used, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficiently high purity to permit its use without lessening the accuracy of the determination.

<sup>5</sup>This method is based on a protocol published by Bowman, D.D., M.D. Little, and R.S. Reimers (2003) Precision and accuracy of an assay for detecting *Ascaris* eggs in various biosolid matrices. Water Research 37(9):2063-2072.

<sup>6</sup>Reagent Chemicals, American Chemical Specifications, American Chemical Society, Washington, D.C. For suggestions on testing of Reagents not listed by the American Chemical Society, see Analar Standards for Laboratory Chemicals, BHD Ltd., Poole, Dorset, U.K. and the United States Pharmacopeia and National Formulary, U.S. Pharmaceutical Convention, Inc. (USPC).



**8.2 Purity of Water** — Unless otherwise indicated, references to water shall be understood to mean reagent water conforming to Specification D 1193, Type I.

**8.3 Preparation of Reagents** — Prepare reagents in accordance with Practice E200.

**8.3.1** Phosphate-buffered water (1 L = 34.0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH adjusted to  $7.2 \pm 0.5$  with 1 N NaOH).

**8.3.2** 1% (v/v) 7X ("ICN" laboratory detergent) (1 L = 999 mL phosphate-buffered water, 1 mL 7X "ICN", Adjust pH to  $7.2 \pm 0.1$  with 1N NaOH).

**8.3.3** Magnesium sulfate, sp. gr. 1.20. (1 L = 215.2 g  $\text{MgSO}_4$ , check specific gravity with a hydrometer; adjust as necessary to reach 1.20).

**8.3.4** Organosilane. For coating glassware. Coat all glassware according to manufacturer's instructions.

**8.3.5** Fresh *Ascaris ova* for positive control, purified from *Ascaris* infected pig fecal material.

## 9.0 Precautions

**9.1** When handling *Ascaris ova* and biosolids, personal protective measures must be employed to prevent infection. Prevention of infection in humans is a matter of good personal hygiene. Wear a laboratory coat at all times in the laboratory. In addition, latex or nitrile gloves and splash protection safety glasses should always be worn in the laboratory. Mouth pipetting is strictly forbidden. Contaminated pipettes are never laid down on the bench top but are immediately placed in a pipette discard container which has disinfectant in it. Contaminated equipment is separated as it is used into containers for disposable materials and containers for re-cycling. After these containers which are always autoclave pans, are full, they are autoclaved for 30 minutes at 121EC and 15 pounds/in<sup>2</sup>. Contaminated glassware is never washed until after it has been autoclaved. Eating, drinking, and smoking in the laboratory is not permitted. Likewise, refrigerators are not to be used for storing lunches or other items for human consumption. If infective *Ascaris ova* are ingested they may cause disease.

## 10.0 Sampling

**10.1** Collect 1 liter of compost, wastewater, or sludge in accordance with Practice D 1066, Specification D 1192, and Practices D 3370, as applicable.

**10.2** Place the sample container(s) on wet ice or around chemical ice and ship back to the laboratory for analysis within 24 hours of collection.

**10.3** Store the samples in the laboratory refrigerated at 2 to 5EC. Do not freeze the samples during transport or storage.

## 11.0 Preparation of Apparatus

**11.1** Test the centrifuge with a tachometer to make sure the revolution's per minute correlate with the speed gauge.

**11.2** Calibrate the incubator temperature with a NIST traceable thermometer.

**11.3** Microscope.

**11.3.1** Clean the microscope optics.

**11.3.2** Adjust the condenser on the microscope, so Köhler illumination is established.

## 12.0 Procedure

**12.1** The percentage moisture of the sample is determined by analyzing a separate portion of the sample, so the final calculation of ova per gram dry weight can be determined. The concentration of ova in liquid sludge samples may be expressed as ova per unit volume.

**12.2** Initial preparation:

**12.2.1** Dry or thick samples: Weigh about 300 g (estimated dry weight) and place in about 500 ml water in a beaker and let soak overnight at 4 - 10EC. Transfer to blender and blend at high for one minute. Divide sample into four beakers.

**12.2.2** Liquid samples: Measure 1,000 ml or more (estimated to contain at least 50 g dry solids) of liquid sample. Place one half of sample in blender. Add about 200 mL water. Blend at high speed for one minute transfer to a beaker. Repeat for other half of sample.

**12.3** Pour the homogenized sample into a 1000 mL tall form beaker and using a wash bottle, thoroughly rinse blender container into beaker. Add 1% 7X to reach 900 ml final volume.

**12.4** Allow sample to settle four hours or overnight at 4 - 10EC. Stir occasionally with a wooden applicator, as needed to ensure that material floating on the surface settles. Additional 1% 7X may be added, and the mixture stirred if necessary.

**12.5** After settling, vacuum aspirate supernatant to just above the layer of solids. Transfer sediment to blender and add water to 500 ml, blend again for one minute at high speed.

**12.6** Transfer to beaker, rinsing blender and add 1% 7X to reach 900 ml. Allow to settle for two hours at 4 - 10EC, vacuum aspirate supernatant to just above the layer of solids.

**12.7** Add 300 ml 1% 7X and stir for five minutes on a magnetic stirrer.

**12.8** Strain homogenized sample through a 20 or 50 mesh sieve placed in a funnel over a tall beaker. Wash sample through sieve with a spray of 1% 7X from a spray bottle.

**12.9** Add 1% 7X to 900 mL final volume and allow to settle for two hours at 4 - 10EC.

**12.10** Vacuum aspirate supernatant to just above layer of solids. Mix sediment and distribute equally to 50 mL graduated conical centrifuge tubes. Thoroughly wash any sediment from beaker into tubes using water from a wash bottle. Bring volume in tubes up to 50 ml with water.

**12.11** Centrifuge for 10 minutes at 1000 X G. Vacuum aspirate supernatant from each tube down to just above the level of sediment. (The packed sediment in each tube should not exceed 5 mL. If it exceeds this volume, add water and distribute the sediment evenly among additional tubes, repeat centrifugation, and vacuum aspirate supernatant.)

**12.12** Add 10 to 15 mL of MgSO<sub>4</sub> solution (specific gravity 1.20) to each tube and mix for 15 to 20 seconds on a vortex mixer. (Use capped tubes to avoid splashing of mixture from the tube.)

**12.13** Add additional MgSO<sub>4</sub> solution (specific gravity 1.20) to each tube to bring volume to 50 mL. Centrifuge for five to ten minutes at 800 to 1000 X g. DO NOT USE BRAKE.

**12.14** Allow the centrifuge to coast to a stop without the brake. Pour the top 25 to 35 mL of supernatant from each tube through a 400 mesh sieve supported in a funnel over a tall beaker.

**12.15** Using a water spray bottle, wash excessive flotation fluid and fine particles through sieve.

**12.16** Rinse sediment collected on the sieve into a 100 mL beaker by directing the stream of water from the wash bottle onto the upper surface of the sieve.

**12.17** After thoroughly washing the sediment from the sieve, transfer the suspension to the required number of 15 mL centrifuge tubes, taking care to rinse the beaker into the tubes. Usually one beaker makes one tube.

**12.18** Centrifuge the tubes for three minutes at 800 X G, then discard the supernatant.

**12.19** If more than one tube has been used for the sample, transfer the sediment to a single tube, fill with water, and repeat centrifugation.

**12.20** Aspirate the supernatant above the solids.

**12.21** Resuspend the solids in 4 mL 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and pour into a 20-mL polyethylene scintillation vial or equivalent with loose caps.

**12.22** Before incubating the vials, mark the liquid level in each vial with a felt tip pen. Incubate the vials, along with control vials containing *Ascaris ova* mixed with 4 mL 0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 26EC for three to four weeks. Every day or so, check the liquid level in each vial. Add reagent grade water up to the initial liquid level line as needed to compensate for evaporation. After 18 days, suspend, by inversion and sample small aliquots of the control cultures once every 2 - 3 days. When the majority of the control *Ascaris ova* are fully embryonated, samples are ready to be examined.

**12.23** Examine the concentrates microscopically using a Sedgwick-Rafter cell to enumerate the detected ova. Classify the ova as either unembryonated, embryonated to the first, second, or third larval stage. In some embryonated *Ascaris ova* the larva may be observed to move. See Figure 1 for examples of various *Ascaris* egg categories.

### 13.0 Calculation

**13.1** Calculate % total solids using the % moisture result:

$$\% \text{ Total solids} = 100\% - \% \text{ moisture}$$

**13.2** Calculate categories of ova/g dry weight in the following manner:

$$\text{Ova/g dry wt} = \frac{(\text{NO}) \times (\text{CV}) \times (\text{FV})}{(\text{SP}) \times (\text{TS})}$$

Where:

NO = no. ova  
CV = chamber volume(= 1 mL)  
FV = final volume in mL  
SP = sample processed in mL or g  
TS = % total solids

### 14.0 Report

**14.1** Report the results as the total number of *Ascaris ova*, number of unembryonated *Ascaris ova*, number of 1st, 2nd, or 3rd stage larva; reported as number of *Ascaris ova* and number of various larval *Ascaris ova* per g dry weight.

### 15.0 Keywords

*Ascaris*, ova, embryonation, viability assay, helminth.

**Notice**

The PEC was consulted in a recent (1998-1999) pilot study by Lyonnaise des Eaux concerning the use of a microscope in making helminth ova counts for different types of sludge. Solids and debris present in the sludge being viewed with the microscope were found to impair ones ability to count. Dilution of raw sludge and digested sludge, however, with phosphate-buffered water prior to analyzing them significantly improved the number of ova that could be counted. Raw sludges were diluted by a factor of 20 and digested sludges by a factor of 5. QA/QC procedures were followed to validate this procedure. The PEC should be consulted for more details.

[revised May 15, 2003]