

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLAUDIA CRISTINA SANTOS FERRAZ

PADRONIZAÇÃO DE INÓCULO PARA RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM
ÁGUA

CURITIBA

2018

CLAUDIA CRISTINA SANTOS FERRAZ

PADRONIZAÇÃO DE INÓCULO PARA RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM
ÁGUA

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal

CURITIBA

2018

A meus queridos avôs, Abílio e Lia Santos e Iole e Izaltino Ferraz (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

A minha família, especialmente aos meus pais, por todo o amor, cuidado, carinho, pela confiança em mim depositada. Serei eternamente grata pela pessoa que sou e por tudo o que conquistei até aqui, tenham certeza que o apoio de vocês foi fundamental em minha vida. A minha querida amiga Fernanda, pois sempre me incentivou e apoiou. A minha tia Laura, que também com seu apoio e carinho foi fundamental, sem isso com certeza eu não teria conseguido.

A meu orientador, professor Diego Averaldo Guiguet Leal, pelo apoio, pelos conselhos, pela confiança em mim depositada desde o primeiro dia em que nos encontramos, por confiar em meu trabalho e acima de tudo pela paciência que teve comigo nos últimos meses. Sua ajuda foi de extrema importância e serei sempre grata por isso.

A minhas companheiras de laboratório, Patrícia e Amanda que nunca negaram apoio durante o desenvolvimento deste projeto.

Todas as vitórias ocultam uma abdicação

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

Toxoplasma gondii, protozoário causador da toxoplasmose, figura no cenário mundial como um protozoário patogênico de grande relevância em saúde pública, especialmente devido ao risco de transmissão transplacentária (congenita) ou possibilidade de ocasionar óbitos em pacientes imunodeprimidos. As vias de transmissão da protozoose são diversas: ingestão de oocistos em alimentos crus, como vegetais e carnes, ingestão de água contaminada e contato com solo contaminado. Surtos epidêmicos por veiculação hídrica vêm sendo relatos nos últimos anos no Brasil e no mundo. No corrente ano, no Brasil, em Santa Maria (Rio Grande do Sul) ocorreu um grande surto de toxoplasmose, tendo a água contaminada com oocistos como fonte provável de origem do surto. No total, até o presente momento foram confirmados 621 casos, onde 54 gestantes tiveram contato com o parasito e, 12 gestantes desenvolveram a toxoplasmose congênita. Foram confirmados 3 óbitos fetais e 3 abortos. Salienta-se que a detecção de oocistos de *T. gondii* em amostras ambientais (água e solo) por outro lado, é bastante complexa e de alto custo. Em adição, métodos padronizados e validados, como o método 1623.1 da agência de proteção ambiental dos estados unidos, destinados à detecção de outros parasitos em amostras ambientais, não estão disponíveis para a detecção de *T. gondii* em água. Além disso, no Brasil os surtos mais recorrentes por esta via de transmissão foram causados pelo protozoário supramencionado. Diante deste cenário, este estudo teve como principal meta padronizar um inóculo a partir de amostras fecais de gatos contendo oocistos de *T. gondii* para posterior emprego do mesmo em ensaios de contaminação artificial de amostras hídricas; realizar um ensaio piloto de contaminação artificial de água reagente, para verificar se seria possível recuperar oocistos de *T. gondii*; realizar o reconhecimento de oocistos de *T. gondii* em microscopia e produzir uma ficha de coleta e leitura. A metodologia empregada seguiu-se com uma etapa de purificação dos oocistos, contagem e padronização do inóculo, contaminação artificial utilizando água reagente; filtração em membrana, leitura do *pellet* e leitura da membrana. A metodologia demonstrou ser eficaz para a recuperação de oocistos a partir da amostra hídrica contaminada artificialmente. O índice de recuperação foi de 2,75%, e a eficiência de recuperação alcançada está de acordo com os resultados encontrados na literatura, considerada baixa. Ressalta-se que neste estudo, não foram utilizadas ferramentas moleculares com a finalidade de aumentar a sensibilidade de detecção e melhoria dos índices de recuperação dos oocistos de *T. gondii*. Contudo, o pré-screening realizado sob microscopia de epifluorescência ainda figura como a melhor ferramenta para detecção de possíveis estruturas oocyst-like em casos de suspeita de surto, para direcionamento de quais amostras devem ser utilizadas para confirmação da contaminação por PCR ou bioensaio. E assim sendo, tal ferramenta pode auxiliar no monitoramento deste protozoário a fim de obter dados, ainda escassos no país e no mundo, acerca da epidemiologia ambiental da toxoplasmose, especialmente em áreas recreacionais ou em mananciais utilizados para captação, tratamento e abastecimento de água. Além disso, ressalta-se a importância de desenvolver uma metodologia rápida e de baixo custo, para isolamento do parasito em água, para que medidas profiláticas ou mitigadoras sejam prontamente adotadas em situação de surto, como o ocorrido recentemente no país.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Oocistos; Detecção; Surtos de Veiculação hídrica.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii, a protozoan that causes toxoplasmosis, appears on the world stage as a pathogenic protozoan of great relevance in public health, especially due to the risk of transplacental (congenital) transmission or the possibility of causing death in immunocompromised patients. The routes of transmission of protozoa are diverse: ingestion of raw foods such as vegetables and meats, ingestion of contaminated water and contact with contaminated soil. Epidemic outbreaks due to water use have been reported in recent years in Brazil and in the world. In the current year, a large outbreak of toxoplasmosis occurred in Santa Maria (Rio Grande do Sul), with water contaminated with oocysts as a probable source of the outbreak. In total, up to the present moment 621 cases were confirmed, where 54 pregnant women had contact with the parasite and 12 developed the congenital toxoplasmosis. Three fetal deaths and three abortions were confirmed. It should be noted that the detection of *T. gondii* oocysts in environmental samples (water and soil) on the other hand is quite complex and costly. In addition, standardized and validated methods, such as the United States Environmental Protection Agency Method 1623.1, for the detection of other parasites in environmental samples, are not available for the detection of *T. gondii* in water. In addition, in Brazil the most recurrent outbreaks by this route of transmission were caused by the aforementioned protozoan. In view of this scenario, the main objective of this study was to standardize an inoculum from fecal samples of cats containing *T. gondii* oocysts for later use in artificial contamination of water samples; carry out a pilot test of artificial contamination of reagent water to verify if it would be possible to recover *T. gondii* oocysts; to perform the recognition of *T. gondii* oocysts under microscopy and to produce a collection and reading record. The methodology used was followed by a step of oocyst purification, inoculum counting and standardization, artificial contamination using reagent water; membrane filtration, pellet reading and membrane reading. The methodology proved to be effective for the recovery of oocysts from the artificially contaminated water sample. The recovery index was 2.75%, and the recovery efficiency achieved is in accordance with the results found in the literature, considered low. It should be noted that in this study, molecular tools were not used in order to increase the sensitivity of detection and improvement of *T. gondii* oocysts recovery rates. However, pre-screening performed under epifluorescence microscopy is still the best tool for detecting possible oocyst-like structures in cases of suspected outbreaks, in order to target which samples should be used to confirm the contamination by PCR or bioassay. Thus, this tool can help in the monitoring of this protozoan in order to obtain data, still scarce in the country and in the world, about the environmental epidemiology of toxoplasmosis, especially in recreational areas or in water sources used for water collection, treatment and water supply. In addition, it is important to develop a rapid and low-cost methodology for isolation of the parasite in water, so that prophylactic or mitigating measures are readily adopted in an outbreak situation, such as that recently occurred in the country.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ciclo Biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	10
FIGURA 2 – Fluxograma.....	24

LISTA DE IMAGENS

PRANCHA 1 - Reconhecimento do padrão de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> sob diferentes tipos de microscopia	28
PRANCHA 2 - Oocistos recuperados em amostra de água reagente sob luz UV	31
PRANCHA 3 - Bolhas e Clarificação visualizadas em membrana	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Investigações epidemiológicas relacionando a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> e exposição a ambientes contaminados por oocistos ao longo de ano(s): relatos de casos esporádicos	14
TABELA 2 - Surtos epidêmicos de veiculação hídrica reportados ao redor do mundo	15
TABELA 3 - Métodos publicados disponíveis para detecção de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em água	26
TABELA 4 - Resultados da contagem de oocistos para padronização do inóculo	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 JUSTIFICATIVA.....	4
3 OBJETIVOS.....	5
3.1 OBJETIVO GERAL.....	5
3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
4.1 HISTÓRICO.....	6
4.2 VIAS DE TRANSMISSÃO.....	7
4.3 CICLO DE VIDA.....	8
4.4 RESISTÊNCIA DOS OOCISTOS A DESINFETANTES E INTEMPÉRIES AMBIENTAIS.....	11
4.5 SURTOS DE TOXOPLASMOSE POR VIA HÍDRICA.....	13
4.6 ASPECTOS CLÍNICOS DA TOXOPLASMOSE.....	16
4.6.1 TOXOPLASMOSE ADQUIRIDA OU PÓS-NATAL.....	17
4.6.2 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA.....	18
4.6.3 TOXOPLASMOSE NO INDIVÍDUO IMUNODEFICIENTE.....	19
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
5.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO PARA MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM ÁGUA.....	19
5.2 PURIFICAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Toxoplasma gondii</i>.....	20
5.3 RECONHECIMENTO DE OOCISTOS EM MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA.....	21
5.4 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO.....	21
5.5 ENSAIO PILOTO PARA AVALIAR A SENSIBILIDADE DA METODOLOGIA PARA RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM ÁGUA.....	22
6 RESULTADOS.....	25
6.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO PARA MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM ÁGUA.....	25
6.2 RECONHECIMENTO DA MORFOLOGIA DOS OOCISTOS EM MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA.....	27
6.3 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO.....	29
6.4 ENSAIO PILOTO PARA AVALIAR A SENSIBILIDADE DA METODOLOGIA PARA RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM ÁGUA.....	30
7 DISCUSSÃO.....	33
7.1 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICE 1 - FICHA DE COLETA E LEITURA.....	54

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose em humanos e demais animais homeotérmicos, é um protozoário zoonótico de ampla distribuição mundial. A toxoplasmose apresenta grande relevância em saúde pública, especialmente devido à possibilidade de transmissão transplacentária (congênita) em gestantes soronegativas e risco de óbito, devido a seu caráter oportunista para indivíduos imunodeficientes (Dubey, 2014; Ware et al., 2010).

Aproximadamente um terço da população mundial já foi exposto ao *Toxoplasma gondii* (Dubey e Beattie, 1988; Tenter et al., 2000); na América do Norte, estima-se que mais de 40 milhões de pessoas apresentem sorologia positiva para *T. gondii*. Em algumas regiões de clima tropical, esta prevalência atinge valores ainda maiores - até 85% da população adulta apresenta sorologia positiva para o parasito - o que demonstra exposição frequente de seres humanos ao protozoário (Canton et al., 2015).

A toxoplasmose apresenta diversas vias de transmissibilidade entre elas: ingestão de oocistos em água, alimentos frescos (verduras / frutas) ou contato com o solo contaminado, ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos em carne crua ou mal cozida, transmissão transplacentária, de mãe para filho, e contato com fluidos diversos contaminados com taquizoítos (Tenter et al., 2000). Apesar da ingestão de cistos teciduais via ingestão de carne crua ou mal cozida ser apontada como a principal fonte de infecção por *T. gondii* em humanos (Pereira et al., 2010), a veiculação hídrica da protozoose tem adquirido importância visto que surtos por esta via têm sido documentados ao redor do mundo, inclusive no Brasil (Efstratiou et al., 2017).

Os oocistos somente são formados mediante processo de reprodução sexuada nos enterócitos dos membros da família Felidae, sendo estes os disseminadores deste estágio evolutivo e responsáveis pela contaminação ambiental da água, solo e alimentos (Dubey, 2013).

Dentre as protozooses de veiculação hídrica, *Cryptosporidium* e *Giardia* foram responsáveis por ocasionar o maior número de surtos epidêmicos em escala mundial nos últimos 30 anos, devido à contaminação de água potável e de águas recreacionais (Karanis et al., 2007; Souza et al., 2012; Leal et al., 2018). Entretanto, do total de surtos de toxoplasmose devidamente documentados no mundo no período de 2004 a 2010, 50,0% destes ocorreram no Brasil (Karanis et al., 2007; Baldursson e Karanis 2011, Efstratiou et al., 2017).

Toxoplasma gondii foi responsável por ocasionar o maior surto por via hídrica já reportado no Brasil e no mundo (Bahia-Oliveira et al., 2003, de Moura et al., 2006). Durante o surto epidêmico ocorrido em Santa Isabel do Ivaí, no Paraná, foram reportados 426 casos suspeitos de toxoplasmose, e 295 casos foram confirmados para a doença (De Moura et al., 2006). Oocistos de *T. gondii* eliminados por uma gata prenha em um reservatório de água da cidade, a qual era captada por poços artesianos da região, e submetida apenas à cloração, deu origem ao surto (Almeida et al., 2011). Este surto apresentou grande importância e repercussão mundial visto que, pela primeira vez, conseguiu-se isolar o parasito da fonte de contaminação suspeita – a água (Vaudaux et al., 2010).

Ressalta-se que o emprego de cloro e seus derivados não é suficiente para inativar oocistos de *T. gondii* (Dumètre e Dardé 2003). No corrente ano, entre março e abril foi documentado um surto de grande proporção, novamente no sul do país, em Santa Maria, (RS), e este, ultrapassou o surto de 2002 em Santa Isabel do Ivaí. Uma investigação realizada pelo Centro de Estudo de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul, em relatório de atualização

do surto, confirmou 621 casos de toxoplasmose, sendo 3 óbitos fetais, 3 abortos e 12 casos de toxoplasmose congênita até o momento (CEVS, 2018).

A poluição de diferentes matrizes hídricas que serão destinadas ao consumo humano contaminadas com protozoários patogênicos, como *T. gondii*, representa uma séria ameaça para milhões de pessoas no mundo (Plutzer e Karanis, 2016). O monitoramento da qualidade da água quanto à potabilidade e para fins recreacionais é realizado tradicionalmente mediante avaliação bacteriológica conforme Portaria Nº 2.194 de 2011 do Ministério da Saúde, sendo realizada a enumeração e detecção de microrganismos indicadores de contaminação fecal (Davis et al., 2009, El-Salam, 2012), entretanto, as legislações mundiais e nacionais não contemplam a inclusão da pesquisa de vírus entéricos e protozoários patogênicos, como *Toxoplasma gondii* na água destinada ao consumo humano (Figueras e Borrego, 2010).

A detecção e recuperação de oocistos de *T. gondii* em amostras ambientais é complexa, sendo os principais fatores limitantes, o pequeno número de oocistos presentes em amostras hídricas e a complexidade inerente às matrizes avaliadas (Plutzer e Karanis 2016). Além disso, observa-se uma escassez de métodos que apresentem boa sensibilidade de detecção e reprodutibilidade, assim como um método padronizado e validado internacionalmente para o diagnóstico ambiental da presença de oocistos de *T. gondii* (Dumètre e Dardé 2003; Kourenti e Karanis, 2006; DaBritz et al., 2007).

A detecção por reação de imunofluorescência direta, com anticorpos específicos direcionados aos epítomos das paredes de oocistos de *T. gondii* não está comercialmente disponível. Entretanto, a triagem inicial da amostra pode ser feita mediante visualização de oocistos em microscopia de epifluorescência sob luz UV. Ressalta-se que para a confirmação definitiva acerca da contaminação por oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras hídricas ou em situação de surto é mediada por ensaios moleculares ou por bioensaios (Dumètre e Dardé, 2003; Plutzer e Karanis 2016).

Deste modo, o monitoramento ambiental deste protozoário se torna por vezes oneroso. Portanto, este estudo teve como principal meta padronizar um inóculo contendo oocistos de *T. gondii* para recuperação do parasito em amostras hídricas.

2 JUSTIFICATIVA

Surtos epidêmicos de toxoplasmose por veiculação hídrica têm sido frequentemente documentados ao redor do mundo (Baldursson e Karanis, 2011), demonstrando o caráter relevante desta protozoose em saúde pública. Em contra partida, a recuperação e detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras ambientais é bastante complicada e desafiadora, demandando processos laboriosos, além da necessidade da confirmação da contaminação em sua maioria, sendo feita por PCR ou por bioensaios com camundongos, investigando a soro-conversão para detecção de anticorpos específicos para toxoplasmose, IgG e IgM mediante reação de imunofluorescência indireta (Dubey e Jones, 2008).

Ainda que não haja uma metodologia padronizada, vários estudos demonstraram a presença de oocistos em diferentes matrizes hídricas (Karanis et al., 2013). Contudo a recuperação de oocistos em água é bastante complexa, e o emprego de inóculo desafiador (poucos oocistos) é recomendado para que se possa chegar mais perto de situações reais (Pineda, 2017).

Portanto, este estudo apresenta como principal meta a padronização de um inóculo de oocistos de *T. gondii* para realização futura de experimentos de contaminação artificial de amostras hídricas e avaliação da eficiência de recuperação destes empregando diferentes metodologias.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Purificar e padronizar um inóculo de oocistos de *Toxoplasma gondii* a partir de amostras fecais de felinos para avaliar a eficiência de recuperação do protozoário em água.

3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar revisão da literatura com a finalidade de verificar os métodos disponíveis para o isolamento de *Toxoplasma gondii* em amostras hídricas
- Caracterizar os oocistos esporulados e não esporulados de *T. gondii* quanto à morfologia e padrão de fluorescência sob microscopia de epifluorescência e microscopia de contraste de interferência
- Elaborar ficha de coleta e leitura de amostras hídricas contendo critérios de positividade para *Toxoplasma gondii*
- Conduzir um ensaio piloto de contaminação artificial com oocistos de *T. gondii* em água reagente

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 HISTÓRICO

Toxoplasma gondii é uma espécie de protozoário coccídeo intracelular obrigatório, que pertence ao filo Apicomplexa (Carneiro et al., 2013). O agente etiológico da toxoplasmose foi descrito simultaneamente no ano de 1908, pelos pesquisadores Nicolle e Manceaux na França e pelo pesquisador brasileiro Splendore. Os franceses encontraram a espécie em uma amostra de fígado de um roedor, *Ctenodactylus gondii*, enquanto Splendore o encontrou em um coelho, mas ele acreditava tratar-se de uma *Leishmania* spp. (Dubey, 2008). A designação da espécie veio no ano seguinte (1909) e foi dada pelos franceses, baseando na morfologia do organismo, “*toxon*” que derivado do grego significa curvo (Weiss e Dubey, 2009).

Nas três décadas seguintes pouca atenção foi dada ao protozoário, mas organismos com formas semelhantes ao *Toxoplasma gondii* continuavam a ser encontradas e relatadas, principalmente em aves (Dubey, 2002 *apud* Dubey, 2008). No início da década de 40, chegou-se a conclusão que este organismo também era capaz de infectar seres humanos (Sabin, 1942 *apud* Dubey, 2008) e que anticorpos humorais conseguiam atuar sobre taquizoítos extracelulares, mas não conseguiam matar os taquizoítos intracelulares (Sabin e Feldman, 1948; Sabin e Olitsky, 1937 *apud* Dubey, 2008). Ainda nessa década, Sabin e Feldman (1948), criaram o *Dye Test*, um método sorológico que através da titulação do nível de anticorpos característicos para *Toxoplasma* foi capaz de detectar a infecção em seres humanos e animais. Apesar da ampla distribuição mundial e apresentar uma enorme variedade de hospedeiros intermediários, englobando animais de sangue quente (aves e mamíferos), existe apenas uma espécie do gênero *Toxoplasma* (Dubey e Su, 2009). Os gatos domésticos foram identificados como hospedeiros definitivos por vários pesquisadores, assim como por

Frenkel e colaboradores (1970), e até hoje os felídeos são considerados os únicos hospedeiros em que ocorre o ciclo sexuado. Neste mesmo ano o ciclo de vida do protozoário foi elucidado (Dubey e Su, 2009).

4.2 VIAS DE TRANSMISSÃO

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais difundidas em todos os continentes devido à ampla diversidade de modos de transmissão da parasitose.

Usualmente, a infecção em humanos pode se dar pelas seguintes vias: ingestão de alimentos contaminados, contato com fezes de gatos domésticos infectados e transmissão vertical (de mãe para filho) durante a gravidez (Borges et al., 2018).

A grande quantidade de oocistos liberados nas fezes de gatos domésticos contaminados e em fase de eliminação é também um fator preocupante: o manuseio das fezes também se torna uma via de infecção uma vez que, é prática comum jogar as fezes dos gatos no vaso sanitário. Assim, o destino inapropriado das fezes destes animais no vaso sanitário, contribuem para a contaminação e introdução do *Toxoplasma gondii* no ambiente devido ao escoamento de águas pluviais ou esgoto (Cole et al., 2000; Miller et al., 2002; Fayer et al., 2004).

Comumente, os surtos de toxoplasmose por via alimentar estão associados ao consumo de carne de ovinos, caprinos, suínos, e aves contaminados com cistos teciduais (Pereira et al., 2010). Segundo alguns estudos, camundongos e porcos podem se infectar ao ingerir um único oocisto, o mesmo presume-se que ocorra para humanos (Dubey et al., 1996). No entanto, práticas de manejo e higiene em criadouros foram otimizadas, reduzindo significativamente a prevalência de cistos de *T. gondii* na carne (Tenter et al., 2000, Dubey et al., 2005).

Ainda assim, a alta prevalência de sorologia para toxoplasmose em humanos indica que existam outras vias de exposição ao protozoário, onde oocistos em água e solo seriam as mais prováveis fontes de aquisição desta parasitose (Ware et al., 2010).

Mais raramente, pode ocorrer a ingestão de taquizoítos mediante consumo de leite cru ou queijos de cabra não submetidos à pasteurização (Dubey et al., 2014). Ressalta-se que a transmissão oral deste estágio evolutivo para adultos, não é considerada uma via expressiva de infecção, entretanto, pode ser responsável pela infecção em recém-nascidos via colostro ou amamentação (Tenter et al., 2000).

Vias secundárias de infecção estariam relacionadas com: transfusão de sangue de indivíduos infectados em fase proliferativa (Sigh e Sehgal, 2010), transfusão de leucócitos (Siegel et al., 1971), transplante de órgãos (Khurana e Brata, 2016) e, através de acidente em laboratório durante o manuseio e experimentos com oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii* ou ao manusear camundongos em bioensaios (Mineo e Vitor, 2018). Outra rota de infecção incomum relaciona-se à relação sexual por esperma contaminado com taquizoítos (Arantes et al., 2009).

4.3 CICLO DE VIDA

Toxoplasma gondii pode ser encontrado em vários tecidos, células nucleadas e fluidos corporais (Dubey et al., 1998). As formas infectantes deste protozoário durante seu ciclo biológico são: taquizoítos (reprodução acelerada), bradizoítos em cistos teciduais (reprodução lenta) e os esporozoítos que estão dentro dos oocistos. Os oocistos quando maduros apresentam dois esporocistos contendo quatro esporozoítos em cada um deles (2 x 4), medindo entre 10-12µm e formato característico oval (Dubey e Lindsay, 2004).

O ciclo biológico do parasito é considerado heteroxeno, com alternância de desenvolvimento em hospedeiros intermediários, classicamente animais homeotérmicos,

incluindo seres humanos e, hospedeiros definitivos – membros da família Felidae (Figura 1). *Toxoplasma gondii* apresenta amplo espectro de hospedeiros e, portanto, especificidade parasitária de tipo eurixeno (Dubey e Lindsay, 2004).

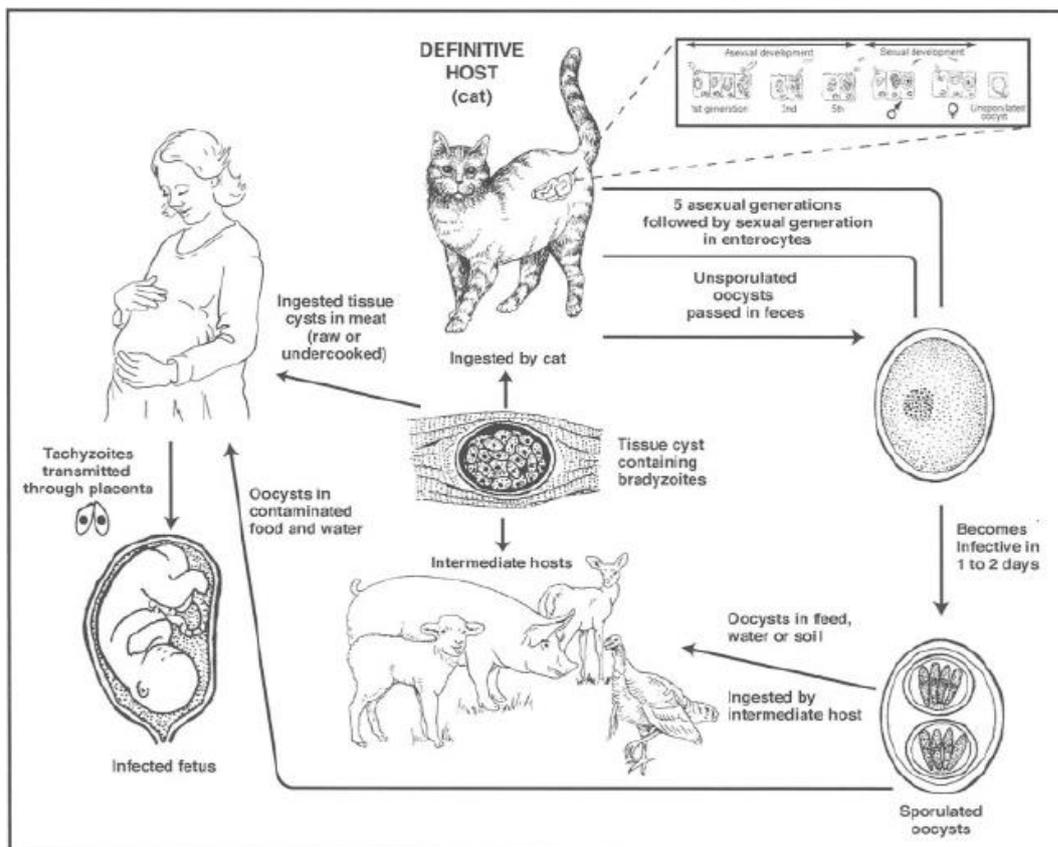
Durante o desenvolvimento do protozoário, observam-se dois tipos de reprodução, sexuada e assexuada. O ciclo assexuado do protozoário ocorre em animais homeotérmicos (hospedeiros intermediários). Nos hospedeiros definitivos, ambas as fases do ciclo biológico do parasito ocorrem. Entretanto, o ciclo enteroepitelial - fase sexuada - ocorre apenas no intestino de felinos enquanto a fase assexuada ocorre em outros tecidos do animal (Dubey e Su, 2009).

As vias de infecção para os hospedeiros intermediários relacionam-se com a ingestão de oocistos maduros (esporulados), ingestão de cistos teciduais em carnes cruas ou malcozidas ou pelo contato com os taquizoítos presente em diversos fluidos corporais, que iniciarão um ciclo de reprodução assexuada em células do hospedeiro (Bonametti et al., 1997). O esporozoíto advindo de um oocisto, ou bradizoítos advindos do cisto se diferenciarão em taquizoítos sofrendo multiplicação intracelular podendo invadir outros tipos de célula do hospedeiro dando origem a novos taquizoítos, que sucessivamente, irão invadir outras células. Os taquizoítos livres se disseminam através da circulação linfática ou hematogênica. Esta fase de proliferação de taquizoítos caracteriza a fase aguda da doença. Independente da fase infectante que originou a infecção em humanos ou demais hospedeiros intermediários, o ciclo assexuado do parasito culminará com a produção de cistos teciduais - fase crônica (Dubey et al., 1998).

A fase sexuada ocorre apenas em células epiteliais do intestino delgado de gatos ou outros felídeos não imunes. Quando o gato ingere cistos teciduais ou oocistos, os bradizoítos ou esporozoítos liberados penetram nas células do epitélio intestinal e, inicia-se um ciclo de reprodução assexuada - merogonia (ciclo esquizogônico) - originando merozoítos. Estes

merozoítos são formados dentro de um vacúolo parasitóforo e, quando este se rompe, os novos merozoítos formados, invadem outras células epiteliais, podendo recomeçar a merogonia. Parte dos merozoítos em um processo conhecido como gametogonia se diferenciam em gamontes / gametócitos que após a maturação, formarão os microgametas masculinos e macrogametas femininos. O microgameta apresenta mobilidade e fecunda o macrogameta. Desta forma, origina-se um zigoto que desenvolverá uma parede externa dupla que dará origem ao oocisto, sendo este eliminado nas fezes dos felídeos (Mineo e Vitor, 2018). Estes oocistos ainda não apresentam capacidade infectante encontrando-se em estado não esporulado. Para que este processo ocorra é necessário um período de 1 a 5 dias no ambiente dependente de aeração, concentração de oxigênio e temperatura adequada, entre 20°C e 30°C (Dubey, 1995). Após a esporulação, os oocistos podem se manter viáveis por até um ano, resistindo à temperatura ambiente entre 20 a 37,5°C (Frenkel et al., 1975). O número de oocistos eliminados por um gato pode variar de 2 a 20×10^6 oocistos por dia durante o período que o animal está infectado e não imune (DaBritz e Conrad, 2010).

FIGURA 1- Ciclo Biológico de *Toxoplasma gondii*



4.4 RESISTÊNCIA DOS OOCISTOS A DESINFETANTES E INTEMPÉRIES AMBIENTAIS

Oocistos de *T. gondii* são disseminados no ambiente, principalmente pelo vento, água, vetores mecânicos (baratas, moscas, formigas) e minhocas no solo (Dubey et al., 1998). Eles podem estar presentes na superfície de matrizes hídricas, em alimentos e no solo. Para oocistos não esporulados, a capacidade de esporular é perdida após um dia a -21°C, em sete dias à 6°C e, após a inativação por calor à 50°C durante 10 minutos (Dubey et al., 1970; Frenkel e Dubey 1973). Para oocistos esporulados, a perda de infectividade ocorre após 15 minutos a 80°C (DaBritz et al., 2010). Acondicionar oocistos esporulados em refrigeradores (4°C), não impede o desenvolvimento da infectividade do oocisto no período entre 6 a 11 semanas (Lindsay et al., 2002). Oocistos esporulados podem manter-se infectantes em água do mar e em água doce por 24 e 54 meses, respectivamente (Dubey, 1998, Lindsay e Dubey, 2009). Porém, o aumento de temperatura resulta no decréscimo de sobrevivência (Dumètre e Dardé, 2003).

O congelamento pode não ser suficiente para degradar oocistos esporulados, pois podem sobreviver até 28 dias à -20°C (Frenkel e Dubey, 1973; Kuticic e Wikerhauser, 1996). Entretanto, com oscilações menos abruptas de temperatura, oocistos esporulados podem permanecer infectantes após vários invernos (Frenkel e Dubey, 1973; Frenkel e Dubey, 1975).

Quando se trata de procedimentos de inativação e especialmente de contato com reagentes químicos, oocistos de *Toxoplasma gondii* são bastante resistentes. Quando mantidos em solução de dicromato de potássio (2,5%) e solução de ácido sulfúrico (2%) à 4°C os oocistos podem manter-se viáveis por vários anos (Dumètre e Dardé, 2003). Frenkel e Dubey (1972) relataram que oocistos também sobreviveram por mais de um ano em frascos contendo ácido sulfúrico (2%) em temperatura constante de 48°C.

Em relação a desinfetantes como hipoclorito de sódio, por exemplo, os oocistos se mostram bastantes resistentes. A exposição ao ozônio também foi testada, demonstrando ser ineficiente para inativação dos oocistos (Wainwright et al., 2007). Para diminuição da infectividade do parasito em 1-log, é preciso tempo mínimo de contato de 1-2h com hipoclorito de sódio em concentração de 6% e, para diminuição de 2-log, são necessárias 4h de contato (Dubey et al., 1998).

Já a utilização de luz UV se demonstrou muito promissora, porém não foi capaz de inativar 100% dos oocistos, sendo necessária a utilização de uma dose de 10-mJ/cm² UV para alcançar uma redução de 3-log (Wainwright et al., 2007; Ware et al., 2010).

A resistência a desinfetantes não é exclusividade de *Toxoplasma gondii*; coccídios em geral possuem esta característica, como *Cryptosporidium* spp. capaz de resistir à cloração, processo utilizado em estações de tratamento de água (Rose et al., 2002). Devido sua resistência a procedimentos de desinfecção e agente físicos, oocistos infectantes podem estar presentes em água e alimentos (Dumètre e Dardé, 2003). Tais dados demonstram que estações de tratamento de água que não adotam a utilização de luz germicida (UV) como uma etapa de desinfecção são ineficientes na inativação de oocistos de vários coccídios, o que representa uma via bastante propícia à disseminação e infecção de um grande número de pessoas.

Considerados em conjunto, os estudos que referenciam a resistência do parasito a fatores abióticos e a desinfetantes, evidenciam que os oocistos de *T. gondii* podem representar um risco significativo para a saúde pública. Desta forma, torna-se relevante o monitoramento sistemático da água destinada ao consumo humano, bem como da qualidade de águas recreacionais devido seu enorme potencial de veiculação hídrica dos oocistos.

4.5 SURTOS DE TOXOPLASMOSE POR VIA HÍDRICA

Rosado-García e colaboradores (2017), revisaram surtos epidêmicos que ocorreram entre os anos de 1979 e 2015 em países da América Latina, e os principais agentes etiológicos dos 16 surtos epidêmicos relatados foram *T. gondii* e *Cyclospora cayetanensis*, com 58,8% e 35,3% respectivamente. Entretanto, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foram os protozoários mais frequentemente detectados em amostras de água de diferentes estudos apontados nesta revisão.

O Brasil lidera o número de estudos acerca da contaminação ambiental por protozoários parasitos e investigação de surtos pela via hídrica na América Latina. Diversos estudos acerca das prováveis fontes de contaminação por oocistos de *Toxoplasma gondii* demonstraram associação entre o contato com diferentes ambientes contaminados e aquisição da infecção em humanos (tabela 1).

Tabela 1. Investigações epidemiológicas relacionando a infecção por *Toxoplasma gondii* e exposição a ambientes contaminados por oocistos ao longo de ano(s): relatos de casos esporádicos.

Ano	Local	Fonte Implicada	Infectados	Referência
1985	Cuba	Água não potável	284	Martinez et al. 1991
1995	Granada	Solo ou água	305	Asthana et al. 2006
1997-1999	Brasil (RJ)	Água sem processo de filtração	823	Bahia-Oliveira et al. 2003
2001	Brasil (AM)	Água sem processo de filtração	191	Cavalcante et al. 2006
2002	Brasil (RO)	Água de poço ou de rio	195	Cavalcante et al. 2006
2003	Brasil (CE)	Gelo caseiro	161	Heukelbach et al. 2007
2003	Guatemala	Água de poço	215	Jones et al. 2005
2003-2004	São Tomé e Príncipe	Água não fervida	375	Hung et al. 2007
2003-2005	Brasil (SC)	Água sem ferver	8	Khan et al. 2006
2004	Turquia	Água não engarrafada	185	Erlug et al. 2005
2004	Canadá	Água municipal e ambiental	548	Messier et al. 2009
2005	Brasil (CE)	Gelo caseiro	666	Sroka et al. 2010
2005	Brasil (BA)	Água não canalizada não tratada	213	Dattoli et al. 2011
2009-2010	Tailândia	Água canalizada de torneira ou chuva	181	Nissapatorn et al. 2011
2012-2014	Iêmen	Poços, cursos d'água e reservatório de água	16	Mahdy et al. 2017

Adaptado de VanWormer et al., 2013; Karanis et al., 2013.

Surtos epidêmicos são constantemente ocasionados por veiculação hídrica, sendo documentados em diferentes regiões do mundo, como na América do Norte, na Ásia e América Latina (Karanis et al., 2007; Baldursson e Karanis, 2011; Rosado-García et al., 2017). Os maiores números de casos confirmados (indivíduos acometidos para toxoplasmose) mediante veiculação hídrica registrou-se no Brasil, Índia e Canadá (Tabela 2).

Conforme menção anterior, o caso de Santa Isabel do Ivaí, noroeste do Paraná, Brasil consta ainda como o maior surto ocorrido no mundo até os dias de hoje (Tabela 2). No Canadá, em Columbia Britânica, durante o ano de 1995, o número de casos suspeitos chegou entre três mil e sete mil casos. Entretanto, o número de casos confirmados ficou em 112 -100 casos de infecção aguda e 12 casos de infecção congênita. A fonte provável apontada para origem do surto foi a contaminação do abastecimento municipal de água do condado (Bowie et al., 1997). Na Vila de Patam, na Guiana Francesa, no ano seguinte à ocorrência de um surto epidêmico que atingiu um número reduzido de pessoas, 11 moradores apresentaram comprometimento visceral por cepas atípicas de *T. gondii* (Demar et al., 2012).

Tabela 2. Surtos epidêmicos de veiculação hídrica reportados ao redor do mundo:

Ano	Local	Fonte Implicada	Casos	Referências
1972	Panamá	Rio	32	Benenson et al. 1982
1995	Canadá	Abastecimento de Água Municipal	112	Bowie et al. 1997
1995-2002	Guiana Francesa	Desconhecida	16	Carme et al. 2002
2001-2002	Brasil	Abastecimento de Água Municipal	295	De Moura et al. 2006
2004-2005	Polônia	Água de Poço	25	Sroka et al. 2006
2004-2005	Índia	Abastecimento de Água Municipal	248	Palanisamy et al.2006 Balasundarum et al. 2010
2006	Guiana Francesa	Água superficial	44	Demar et al. 2012

Adaptado de VanWormer et al., 2013; Karanis et al., 2013.

A toxoplasmose ocorre frequentemente em regiões do mundo que possuem clima quente, úmido e com altitudes baixas (CDC, 2014). Desde o ano 2000 vêm crescendo o número de surtos epidêmicos por veiculação hídrica de *Toxoplasma gondii* no Brasil, exaltando a importância que esta doença e esta via, têm adquirido em termos de saúde pública.

Sabe-se também, que no corrente ano, novamente na região sul do país - na cidade de Santa Maria (RS) originou-se um novo surto de toxoplasmose de grandes proporções, que ultrapassa o surto paranaense de Santa Isabel do Ivaí (PR) em número de casos confirmados.

Além dos surtos recentes, é importante destacar que nesta região circulam os subtipos mais virulentos do protozoário (Pena et al., 2008), evidenciando a necessidade de desenvolver uma metodologia que seja rápida e simples para detecção de oocistos em diferentes amostras hídricas.

4.6 ASPECTOS CLÍNICOS DA TOXOPLASMOSE

O período de incubação da toxoplasmose varia conforme a via que originou a infecção: após a ingestão de carne mal cozida entre 10 a 23 dias, e de 5 a 20 dias após a ingestão de oocistos (Jones et al., 2001). Em sua maioria, os casos de toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes são assintomáticos. As manifestações clínicas mais comuns são o aparecimento de um único nódulo cervical posterior aumentado (linfadenopatia) e a astenia sem febre (Borges et al., 2018). Ocasionalmente, a linfadenopatia pode vir acompanhada de hepatoesplenomegalia, mal-estar, cefaleia, mialgia, febre, astenia, exantema máculo-papular e odinofagia (Amato Neto e Marchi, 2002).

Entretanto, cerca de 10% a 20% dos adultos infectados na fase aguda, apresentam as seguintes formas clínicas: erupção cutânea, retinocoroidite, miosite, hepatite, pneumonite e meningoencefalite (Amaro Neto e Marchi, 2002).

Em geral, tais sintomas duram apenas algumas semanas, mas em casos de adenomegalia e hepatoesplenomegalia os sintomas podem durar meses. Encefalite, miocardite e pneumonite raramente ocorrem, com exceção em pacientes imunocomprometidos (Mitsuka-Breganó et al., 2010). A retinocoroidite também é bastante rara, mas Silveira (2002) estimou

que entre 12% a 15% das pessoas infectadas podem desenvolver a lesão ocular em algum momento da vida.

4.6.1 TOXOPLASMOSE ADQUIRIDA OU PÓS-NATAL

Dependendo do estado de imunidade que se encontra o indivíduo infectado, a toxoplasmose pode apresentar casos benignos até mesmo levar à morte (Dubey, 2002 *apud* Dubey, 2008). Para estes dois extremos, dependendo da localização do parasito, há variadas situações. Entre elas, as mais comuns são a forma ganglionar (ou febril aguda) e a toxoplasmose ocular.

- **GANGLIONAR FEBRIL;** esta é a forma mais frequente encontrada entre crianças e adultos. O quadro clínico mais usual é representado por febre alta e comprometimento ganglionar generalizado, podendo ser acompanhado de mialgia, dor abdominal, hepatoesplenomegalia, mal-estar e exantema. A duração geralmente é crônica e benigna, podendo às vezes levar à complicações de outros órgãos (Butler et al., 2013).

- **TOXOPLASMOSE OCULAR;** a lesão ocular mais comumente associada à toxoplasmose é a retinocoroidite (inflamação da retina e da coroide) sendo de 30% a 60% dos casos de inflamação associados ao *Toxoplasma gondii* (Mineo e Vitor, 2018). Durante a infecção aguda, a presença de taquizoítos na retina e na coroide causam lesões. Os taquizoítos chegam à retina através da circulação sanguínea ou dentro de macrófagos circulantes, que são temporariamente sequestrados para dentro de capilares da retina. Quando a toxoplasmose ocular está ativa, ela consiste em um foco coagulativo e necrótico, podendo ainda ocorrer a formação de cistos ao redor do olho (Butler et al., 2013).

4.6.2 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A toxoplasmose congênita é uma das formas mais graves da doença em grávidas soronegativas, quando não possuem imunoglobulinas de memória imunológica (IgG), e o parasito atinge o feto por via transplacentária causando danos com diferentes graus de severidade. Fatores como virulência, cepa do parasito e também do período gestacional em que a mulher se encontra, pode resultar em aborto ou complicações para o feto devido a tetrade de Sabin, que se caracteriza por microcefalia com hidrocefalia, coriorretinite, retardo mental e calcificações intracranianas (Dunn et al., 1999).

Na maioria das vezes, no momento do nascimento, as infecções congênitas são assintomáticas, porém, podem apresentar sequelas que se manifestam em algum momento da vida, principalmente complicações oculares e do sistema nervoso central. Muitos casos de retinocoroidite têm como causa a toxoplasmose congênita. (Beverly, 1973). De acordo com Wilson e colaboradores (1980), entre os recém-nascidos infectados e assintomáticos, acima de 85% desenvolvem retinocoroidite durante a infância ou adolescência e 40% apresentam sequelas neurológicas – retardamento psicomotor e alteração do volume craniano – micro ou macrocefalia. Outras possíveis manifestações clínicas são: encefalite, icterícia, anemia, epilepsia, *rash* cutâneo e pneumonite (Mineo e Vitor, 2018).

4.6.3 TOXOPLASMOSE NO INDIVÍDUO IMUNODEFICIENTE

Indivíduos imunodeficientes englobam desde pacientes infectados pelo HIV, pacientes com doenças linfoproliferativas, pacientes que realizam quimioterapia ou transplante de órgãos. A toxoplasmose nesta categoria populacional apresenta-se com caráter oportunista e

quadro grave de evolução em indivíduos com sistema imune comprometido causando encefalite, retinite ou doença sistêmica.

A encefalite em pacientes imunocomprometidos é a manifestação mais grave da toxoplasmose devido à reativação de cistos cerebrais que se transformam em taquizoítos livres circulantes pelo sangue (Hill e Dubey, 2002). Estima-se que até 40% de todos os casos de encefalite em indivíduos imunodeprimidos são ocasionados por *Toxoplasma gondii* – encefalite toxoplásmica.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO PARA MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE *Toxoplasma gondii* em água

Com a finalidade de obter dados acerca da contaminação por *Toxoplasma gondii* em amostras ambientais diversas, surtos de veiculação hídrica e, especialmente dos métodos disponíveis para detecção do protozoário em água, foram realizadas busca de dados bibliográficos em periódicos científicos mediante consulta das plataformas SCOPUS e PUBMED durante os meses de julho à outubro. Para tanto, utilizou-se os seguintes descritores:

- “*Toxoplasma gondii*” AND “water”
- “*Toxoplasma gondii*” AND “waterborne outbreaks”
- “*Toxoplasma gondii*” AND “methods AND water”
- “*Toxoplasma gondii*” AND “water” AND “recovery”

5.2 PURIFICAÇÃO DE OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii*

Para o presente estudo, fezes de gato contendo oocistos esporulados e não esporulados em solução de ácido sulfúrico (2,5%) foram gentilmente doadas pelo Professor Doutor João Luiz García, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina (UEL). As alíquotas fecais foram mantidas em tubo falcon de 50 ml armazenado à 4°C até o início dos experimentos.

Para a produção do inóculo o material foi homogeneizado por 2 minutos em vortéx, e então recolhido 2 ml da suspensão fecal, sendo esta transferida para um tubo tipo eppendorf esterilizado. Para manipulação dos oocistos esporulados, os mesmos foram inativados por calor através de banho maria à 80°C por 15 minutos visto que o material representa risco biológico (DaBritz et al., 2007). Após a inativação ser concluída, iniciou-se a etapa de purificação dos oocistos, segundo Dubey et al., 1970, com modificações.

Retirou-se 2 ml da suspensão estoque inativada transferindo-a para um tubo falcon de 15ml. Em seguida, adicionou-se 10 ml de água destilada ao tubo para remoção do ácido sulfúrico (2,5%). O tubo foi submetido a centrifugação à 1500 x *g* por 15 minutos, adaptando-se a velocidade de centrifugação recomendada pela Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) de acordo com preconização do Método 1623.1 para concentração de protozoários em amostras hídricas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e realizado centrífugo-flutuação em sacarose (gr. sp.=1.20 g/mL) por 10 minutos a 1250 x *g* conforme descrito por Aubert e Villena (2009).

Após este procedimento, foram recolhidos 3 ml do sobrenadante, e realizado uma nova lavagem com água destilada e centrifugação a 1500 x *g* por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* recolhido e armazenado em tubo tipo eppendorf à 4°C, compondo a solução de uso para posterior enumeração dos oocistos e padronização do inóculo.

5.3 RECONHECIMENTO DE OOCISTOS EM MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA

Com a finalidade de observar as características morfológicas dos oocistos de *T. gondii*, alíquotas de 1µl da suspensão purificada foram colocadas em lâminas e, adicionou-se 19 µl de água destilada ao material, sendo este recoberto com lamínula.

Para o reconhecimento das estruturas parasitárias, as lâminas foram posicionadas em microscópio de epifluorescência, (Olympus BX51) utilizando o filtro de luz UV (filtro de excitação de 330-385nm) conforme Verant et. al (2014) e Microscopia de Contraste Diferencial de Interferência (DIC), no Centro de Tecnologias Avançadas em Epifluorescência, do Centro Politécnico, na Universidade Federal do Paraná para observação dos oocistos mediante autofluorescência.

Para a confirmação morfológica dos oocistos, os seguintes critérios foram analisados mediante imunofluorescência e microscopia de contraste de interferência: o formato das estruturas parasitárias, o grau, tonalidade e intensidade de autofluorescência, textura da parede e o seu tamanho.

A caracterização dos oocistos mediante as técnicas descritas anteriormente, subsidiaram os dados necessários para a confecção de uma ficha de coleta, leitura e elaboração de critérios de positividade para oocistos de *T. gondii* para futuros ensaios de *screening* do protozoário em amostras ambientais.

5.4 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO:

Para contagem do inóculo, foram produzidas 10 lâminas contendo cada uma 10ul da solução estoque e 10ul de água destilada. A leitura das amostras obedeceu aos mesmos

critérios de microscopia descritos no item 5.3. Ao final das contagens foi realizada a média para obtenção da quantidade de oocistos em 10ul da suspensão estoque para posterior utilização do inoculo em ensaios de contaminação artificial.

5.5 ENSAIO PILOTO PARA AVALIAR A SENSIBILIDADE DA METODOLOGIA PARA RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM ÁGUA.

Para recuperação dos oocistos de *Toxoplasma gondii*, o método utilizado foi a técnica de filtração em membranas de ésteres mistos de celulose (47 mm, porosidade nominal de 3um) de acordo com Franco et al., 2001 com modificações (Fluxograma 1).

Realizou-se inicialmente uma contaminação de água destilada com a finalidade de verificar a precisão inicial da metodologia empregada, ou seja, verificar se algum oocisto seria recuperado a partir da matriz contaminada artificialmente.

A contaminação com oocistos de *T. gondii* foi realizada utilizando-se 1l de água destilada. Após inoculação de 10 microlitros da suspensão purificada, a amostra contaminada foi submetida à agitação por 10 minutos. Em seguida, a amostra contaminada foi filtrada utilizando-se o sistema de micro funil e membranas (Millipore®, Alemanha), conforme descrito anteriormente no item 5.2, com auxílio de bomba de vácuo (fluxo de filtração de 0,4 a 4L / min).

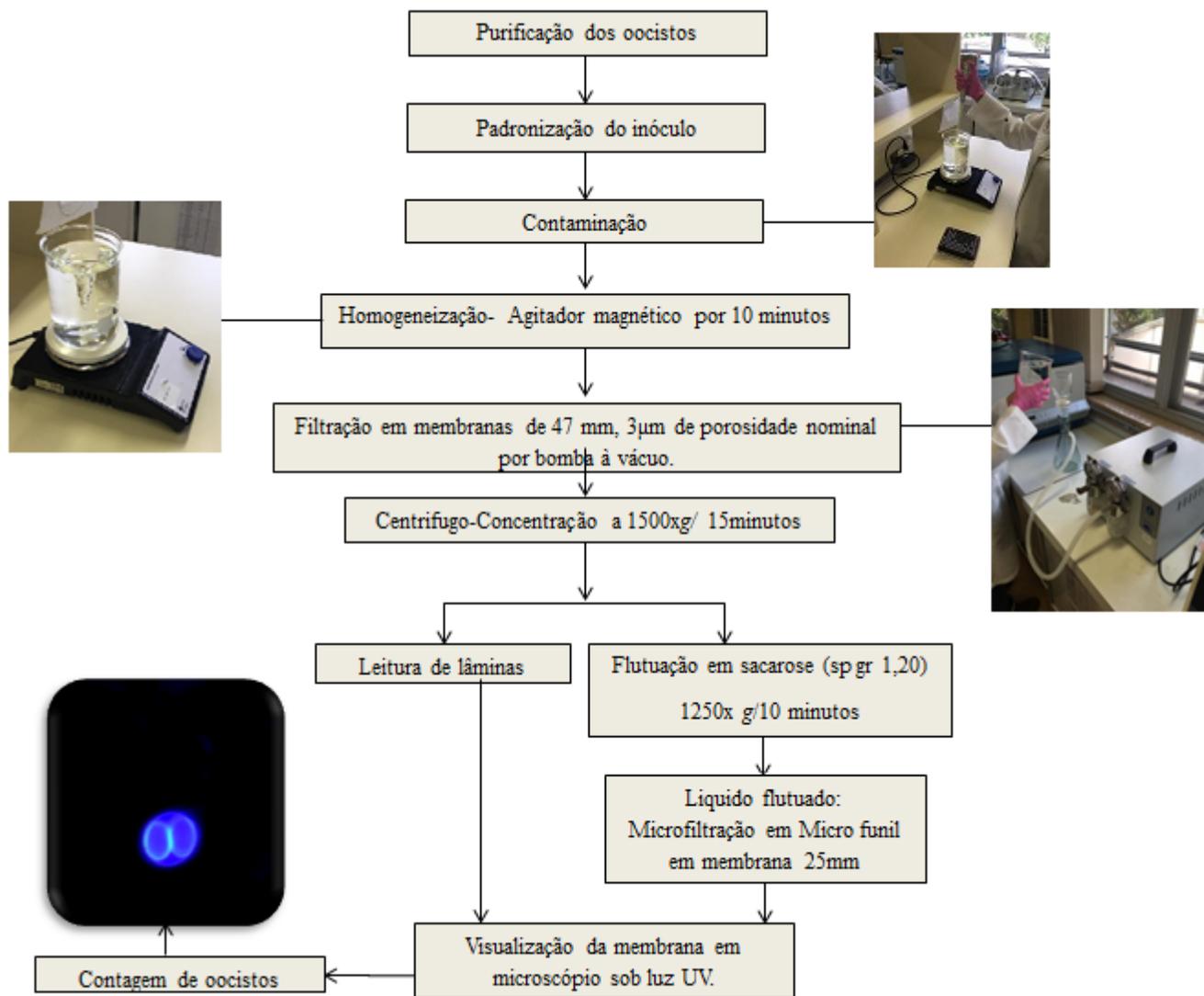
Após a filtração, removeu-se a membrana do porta filtro, sendo esta posicionada em placa *petri* plástica. A etapa de eluição dos oocistos a partir da membrana foi conduzida alternando-se lavagem e raspagem da mesma com alças plásticas macias e pipeta Pasteur por 20 minutos, adicionando-se solução surfactante (Tween 80 0,1%). O eluato foi transferido para tubos falcon de 15 ml e centrifugado por 20 minutos a 1500 x *g*. O sobrenadante foi

descartado e ao *pellet* foi adicionado 10 ml de água destilada, sendo realizada nova centrifugação nas mesmas condições.

Em seguida, foi realizada a etapa de centrífugo-flutuação por sacarose (gr. sp.=1.20 g/mL) por 10 minutos a 1250 x *g* (Aubert e Villena, 2009), sendo os 2 ml superficiais recolhidos e transferidos para um novo tubo falcon. Ao eluato recolhido, foram adicionados 10 ml de água destilada e realizada novamente uma centrifugação (20 minutos a 1500 x *g*), para remoção da sacarose. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* final foi acondicionado em tubo tipo eppendorf à 4°C.

Para leitura da amostra um terço do *pellet* armazenado foi utilizado para confecções de lâminas (n = 8 lâminas confeccionadas / 10ul por lâmina) que foram lidas em microscopia de epifluorescência. O restante do *pellet* foi filtrado em sistema de micro funil com membrana de 25 mm de diâmetro de éster de celulose (5µm de porosidade nominal - Millipore®, Alemanha) com a utilização de bomba à vácuo. A membrana foi retirada e colocada em uma lâmina. A membrana recebeu um meio de montagem sendo recoberta com uma lamínula. A verificação da presença de oocistos foi feita através da análise das lâminas em microscopia de epifluorescência (Fluxograma 1).

FLUXOGRAMA 1



6 RESULTADOS

6.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO PARA MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE *Toxoplasma gondii* EM ÁGUA

Em busca feita nas plataformas mencionadas no item 5.1, foram encontrados 469 resultados para “*Toxoplasma gondii*” and “water”, 52 resultados para “*Toxoplasma gondii*” and “waterborne outbreaks”, 152 resultados para “*Toxoplasma gondii*” and “methods” and “water” e 17 resultados para “*Toxoplasma gondii*” AND “water” AND “recovery”. Os critérios de escolha dos artigos utilizados neste estudo (n = 30 artigos) foram o enfoque dado aos métodos de detecção e isolamento de oocistos em amostras hídricas diversas.

De acordo com a literatura, os métodos disponíveis para o processamento de amostras hídricas e detecção de oocistos de *T. gondii* (Tabela 3) incluem os seguintes passos: filtração de grandes volumes de água (Isaac-Renton et al., 1998; Villena et al., 2004), floculação (Kourenti et al., 2003; Kourenti e Karanis, 2004) ou flutuação (Dubey e Beattie, 1998; Isaac-Renton et al., 1998, Villena et al., 2004). A detecção de oocistos é realizada por microscopia (Dubey et al., 1970), bioensaios com camundongos (Dubey et al., 1995; Isaac-Renton et al., 1998, Villena et al., 2004), e utilização de ferramentas moleculares visando a amplificação dos genes *BI* e Elemento de repetição 529 (Homan et al., 2000; Sotiriadou e Karanis, 2008).

Tabela 3. Métodos publicados disponíveis para detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em água.

Amostra hídrica	Laboratório ou Campo	Concentração	Deteção	Quantitativo	Referência
Torneira, água doce, marinha	L	Ultrafiltração e cápsula de filtração	Microscopia, PCR em tempo real e PCR	Sim	Shapiro et al., 2010
Torneira, água doce	L	Canal contínuo de separação	Microscopia	Sim	Borchardt et al., 2009
Água doce	L	Cápsula de filtração	PCR em tempo real	Sim	Yang et al., 2009
Água doce	L e C	Cápsula de filtração	PCR, bioensaio	Não	Aubert e Villena., 2009
Água doce	L e C	Floculação $Al_2(SO_4)_3$	Amplificação isotérmica mediada por loop	Não	Sotiriadou e Karanis, 2008
Torneira, água doce	L e C	Cápsula de filtração	Separação Imunogenética	Sim	Dumètre e Dardé, 2005, 2007.
Torneira, água doce, marinha	L e C	Floculação $Al_2(SO_4)_3$	PCR	Não	Kourenti e Karanis, 2006
Desionizada, água doce	L e C	Cápsula de filtração	PCR, bioensaio	Não	Villena et al., 2004
Água doce	L	Floculação $Al_2(SO_4)_3$ e $Fe_2(SO_4)_3$	PCR	Não	Kourenti e Karanis, 2004
Água destilada, torneira	L	Centrifugação e Floculação $Al_2(SO_4)_3$ e $Fe_2(SO_4)_3$	Microscopia	Sim	Kourenti e Karanis, 2003
Torneira	L e C	Cápsula de Filtração	Bioensaio	Não	Isaac-Renton et al., 1998
Marinha	C	Filtração	Microscopia	Sim	Verant et al, 2014

Adaptado de VanWormer et al., 2013; Verant et. al, 2014.

L = Laboratório

C = Campo

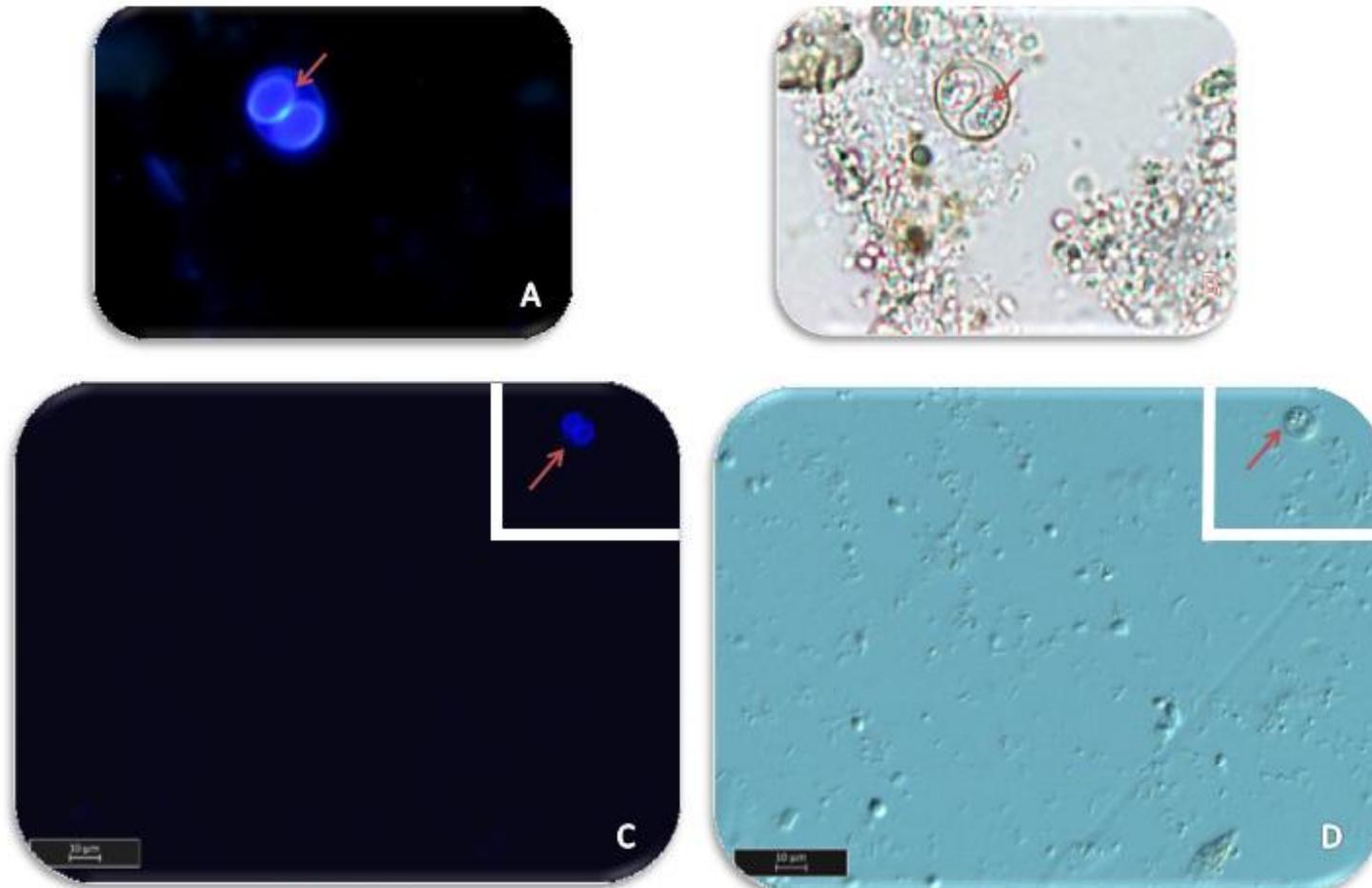
6.2 RECONHECIMENTO DA MORFOLOGIA DOS OOCISTOS EM MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA

Após a inativação por calor, foi observado que as estruturas mantiveram sua morfologia inalterada e autofluorescência quando excitados sob luz UV (Prancha 1).

Os oocistos apresentaram forma esférica quando esporulados - com dois esporocistos cada. A coloração foi verificada, demonstrando desde um tom azul neon (Prancha 1 – Figura C) até um tom azul pálido esbranquiçado, predominante na parede dos esporocistos (Prancha 1 – Figura A).

A análise mediante microscopia de contraste de interferência diferencial dos oocistos revelou que os mesmos, quando íntegros, apresentam-se com: parede lisa (macia), sem poros, invaginações e estriações, bem como, tamanho entre 10-12 μm . Conferir dados na Ficha de Coleta e Leitura em Apêndice 1.

Prancha 1: Reconhecimento do padrão de oocistos de *Toxoplasma gondii* sob diferentes tipos de microscopia



LEGENDA: A- oocisto esporulado com dois esporocistos indicados pela seta (sob luz UV, 400x) B- oocisto esporulado com esporozoítos indicados pela seta (em DIC, 400x) C- oocisto esporulado (sob luz UV, 200x) D- oocisto esporulado (em DIC, 200x). (A autora)

6.3 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Para produção do inóculo a partir da suspensão fecal purificada, foi realizada a contagem de 10 lâminas e a média alcançada foi de 364,2 oocistos por 10 microlitros (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados da contagem de oocistos para padronização do inóculo

Lâminas	Oocistos
1	300
2	317
3	400
4	428
5	324
6	321
7	426
8	414
9	324
10	341
TOTAL	3595
MÉDIA	359

6.4 ENSAIO PILOTO PARA AVALIAR A SENSIBILIDADE DA METODOLOGIA DE RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM ÁGUA.

A partir do *pellet* obtido da amostra processada, foi possível recuperar oocistos mediante a visualização das formas parasitárias com o emprego de duas metodologias: contagem de lâminas e filtração em sistema de micro funil com membrana de 25 mm.

No total, recuperou-se 10 oocistos, sendo 8 deles visualizados em contagens de lâminas a partir da leitura direta do sedimento e, 2 deles, foram recuperados após filtração do restante do sedimento final diretamente na membrana de 25 mm (Prancha 2), gerando um índice de recuperação total de 2,75% (10 oocistos em 359 oocistos possíveis*). Uma das estruturas encontradas apresentou deformidades na parede do oocisto esporulado (Prancha 2 – Figura A). Outra estrutura encontrada não estava esporulada (Prancha 2 – Figura B)

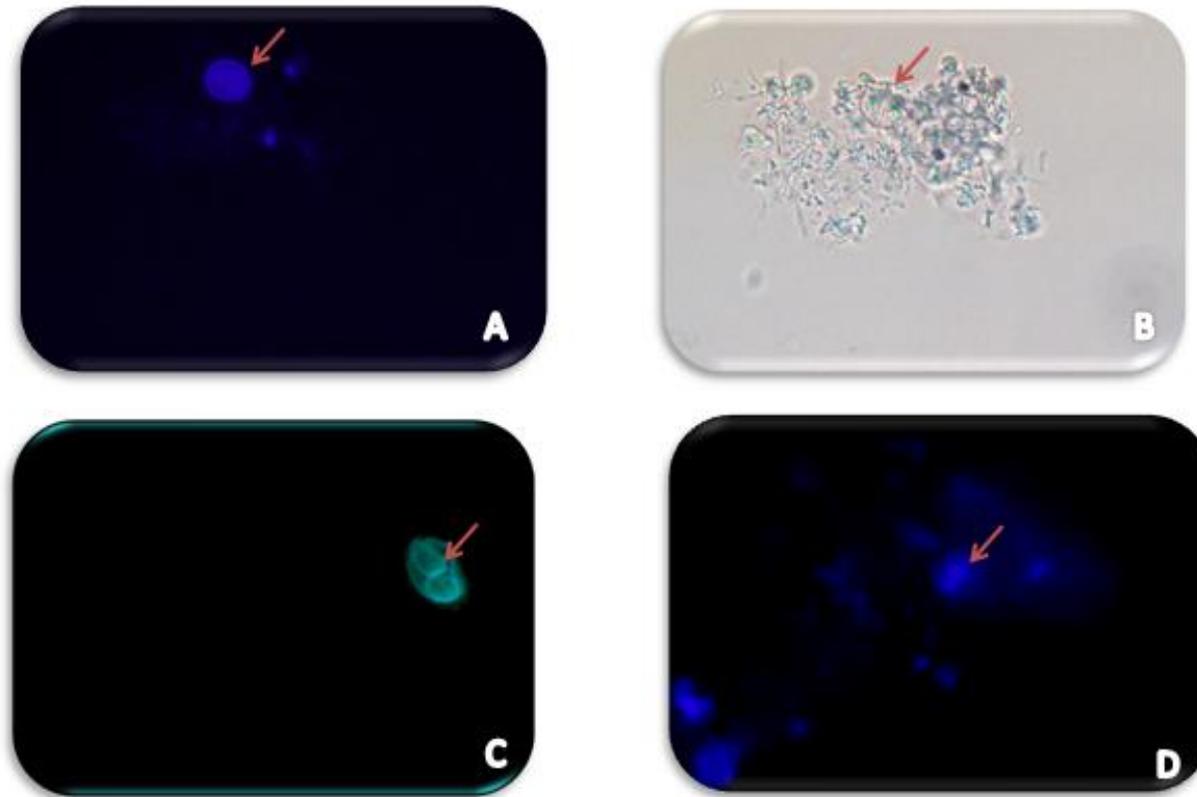
Durante a observação da membrana sob microscopia, foram encontradas muitas bolhas ao longo da lâmina (Prancha 3 - Figura A e B), e também foi visto a clarificação proveniente do uso do meio de montagem.

*Foram inoculados 359 oocistos e apenas 10 foram recuperados, fazendo a regra de três:

359 – 100%

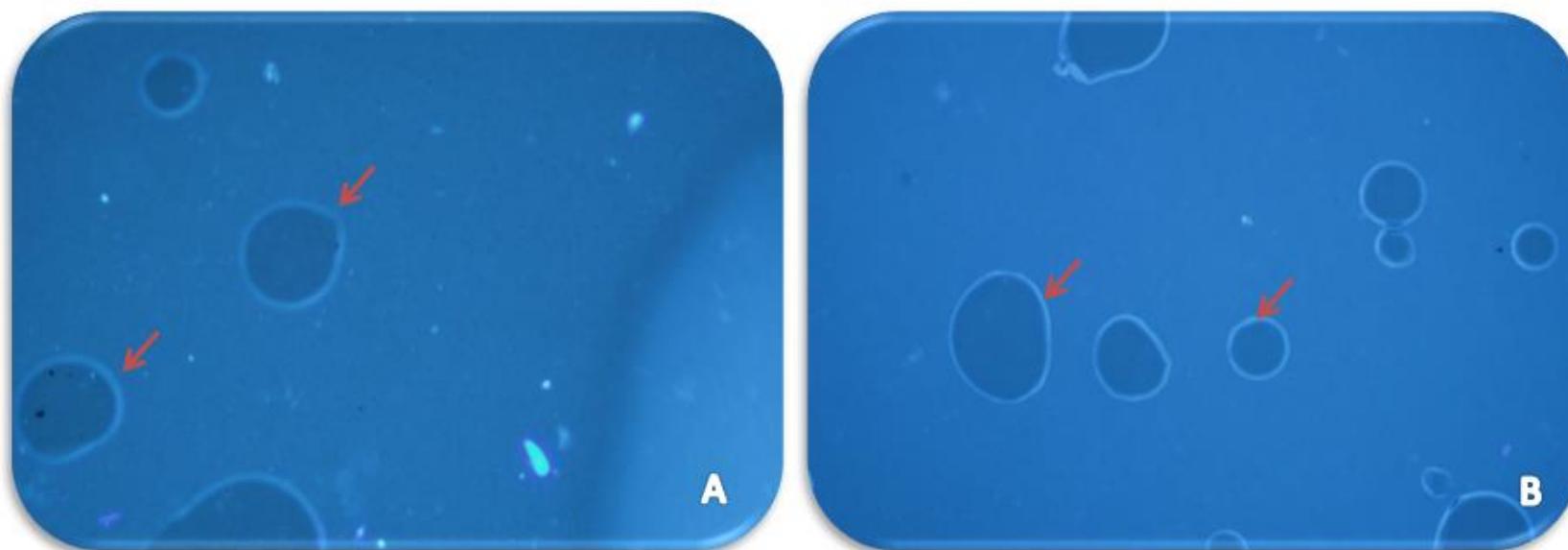
10 – 2,75%.

Prancha 2: Oocistos recuperados em amostra de água reagentes sob luz UV



LEGENDA: A- oocisto não esporulado indicado pela seta (sob luz UV, 400x) B- oocisto não esporulado indicado pela seta (DIC, 400x) C- oocisto esporulado, com dois esporocistos (sob luz UV, 400x) D- oocisto esporulado indicado pela seta (sob luz UV, 400x) (A autora)

Prancha 3: Bolhas e Clarificação visualizadas em membrana 25mm.



LEGENDA: A e B - Presença de múltiplas bolhas visualizadas em membrana 25mm sob microscopia de epifluorescência em filtro UV, 200x.
(A autora)

7 DISCUSSÃO

Considera-se importante a investigação, notificação de surtos epidêmicos de toxoplasmose por veiculação hídrica e a adoção de medidas mitigadoras para prevenção de contaminação de mananciais e da água destinada ao consumo humano (Dumètre e Dardé, 2003; Karanis et al., 2007). O monitoramento da qualidade da água que será ofertada a população, bem como a utilização de tecnologias de desinfecção que inativem o parasito, tem como principal alvo a proteção da saúde pública, devido especialmente ao caráter oportunista exibido pelo protozoário e risco de óbito para indivíduos imunodeficientes (Nissapatorn, 2009). Além disso, considera-se como prioridade a proteção da saúde de gestantes soronegativas a fim de evitar a infecção do feto, abortos e, o desenvolvimento de sequelas para o mesmo decorrentes da Tétrade de Sabin (Dubey, 2002 *apud* Dubey, 2008).

De fato, isto não é uma preocupação somente de autoridades de saúde pública ou de vigilância epidemiológica no Brasil – onde os surtos de maior expressão mundial ocorreram – mas sim, uma realidade em diversos países do mundo (Karanis et al., 2007; Baldursson e Karanis, 2011; Karanis et al., 2012).

Protozooses de veiculação hídrica, entre elas a giardiose, criptosporidiose e, em anos recentes a toxoplasmose, não apresentam correlação com status socioeconômico, e condições de saneamento básico, visto que estas parasitoses figuram entre as principais doenças transmitidas a população das nações desenvolvidas, que contam com elevado padrão de tratamento de água e esgoto (Fletcher et al., 2012)

Uma preocupação atual e com importantes implicações em saúde pública, consiste nas tecnologias disponíveis para inativação de patógenos em água antes desta ser distribuída para a população, sendo que devido à facilidade de utilização e baixo custo, a adição de cloro

e seus derivados é a mais amplamente utilizada por diversos países do mundo, inclusive o Brasil (Brasil, 2011; USEPA, 2012).

De 1984 até o ano de 2010, 524 surtos epidêmicos por veiculação hídrica foram registrados, sendo *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., os agentes etiológicos predominantes em 285 e 202 surtos epidêmicos respectivamente. *T. gondii* havia sido associado em apenas sete surtos conforme descrito por Plutzer e Karanis (2016). Isto se deve ao fato deste protozoário junto com *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*, *Balantidium coli*, e outras amebas de vida livre, comporem um grupo negligenciado de parasitos transmitidos pela água. Entretanto, o número de surtos via água por *Toxoplasma gondii* e indivíduos acometidos com sequelas, inclusive oculares, têm crescido mundialmente (Bem Ayed et al., 2012).

O Brasil tem registrado os surtos mais importantes da parasitose por esta via de transmissão, sendo que os surtos de maior magnitude e expressividade clínica ocorreram no sul do país, em Santa Isabel do Ivaí, Paraná (Bahia-Oliveira et al., 2003, de Moura et al., 2006) e em Santa Maria, Rio Grande do Sul (CEVS, 2018), sabidamente onde circulam os subtipos mais virulentos de *T. gondii* (Pena et. al., 2008).

A principal meta do presente estudo foi alcançada, visto que, o reconhecimento, padronização de inóculo e recuperação de oocistos de *Toxoplasma gondii* foram efetuados. Mesmo em um ensaio piloto, onde se optou por realizar duas estratégias de visualização, foi possível recuperar oocistos do parasito (Prancha 2). A eficiência de recuperação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de água recreacionais, por exemplo, varia de 0 a 8,8 % (Plutzer e Karanis, 2016). Para contaminação em água reagentes, o índice de recuperação de oocistos varia de 4% a 21,5% (comunicação pessoal Dra. Regina Maura Bueno Franco). No presente estudo o índice alcançado foi de 2,75%. A baixa eficiência de recuperação de oocistos de *Toxoplasma gondii*, não representa surpresa, visto que em nível mundial, não existe um consenso sobre a melhor forma de detectar o parasito em água, carecendo ainda de

um método que apresente boa sensibilidade e especificidade de detecção (Jones and Dubey, 2010; Efstratiou, 2017). No presente estudo, a técnica de concentração dos protozoários (filtração em membrana) pode ter influenciado na recuperação dos mesmos, visto que na etapa de eluição dos microrganismos, utilizou-se solução surfactante para recuperação dos mesmos na matriz filtrante. Isto não representa empecilho para a detecção de outros protozoários como *Giardia* e *Cryptosporidium*, visto que alíquotas do sedimento são utilizadas para detecção com técnicas imunológicas que apresentam alta sensibilidade, como a reação de Imunofluorescência Direta em lâminas.

Entretanto, umas das metodologias recomendadas para a detecção de *T. gondii* em água, também adotada no presente estudo, relaciona-se com a visualização direta dos oocistos em membrana, por autofluorescência e, devido à presença de bolhas formadas durante o processo de eluição, bem como a clarificação excessiva da membrana devido à composição do meio de montagem usado para confecção da lâmina (Prancha 3), tornou a visualização das formas parasitárias limitada, o que pode ter contribuído para uma recuperação dentro dos parâmetros observados em vários estudos, considerada baixa (Jones e Dubey, 2010).

As estruturas observadas na membrana demonstraram algumas pequenas variações na parede do oocisto esporulado (Prancha 2- Fig. C). Isto se deve provavelmente ao uso da bomba de vácuo utilizada para filtrar parte do sedimento na membrana menor (25mm). Este fato também foi observado por Verant et al., 2014.

Também, verificou-se estruturas de oocistos em caráter não esporulado na membrana. Por se tratar de amostra contaminada artificialmente e, mediante visualização por DIC, as estruturas foram consideradas como positivas para *T. gondii*, visto que atenderam aos critérios de positividade e aos requisitos necessários para confirmação da mesma de acordo com a ficha de leitura das amostras elaborada para o presente estudo (apêndice 1) (Prancha 2).

Salienta-se que a técnica de filtração em membranas é a mais amplamente utilizada em países da América Latina, especialmente no Brasil – que lidera os relatos de ocorrência de protozoários patogênicos – para o isolamento dos mesmos em amostras de água no continente, devido à facilidade de execução e baixo custo (Rosado-García et al., 2017).

Em adição, alguns autores sugerem que a concentração por floculação em carbonato de cálcio se mostra eficaz para recuperar oocistos de *T. gondii* (Kourenti e Karanis, 2006; Sotiriadou e Karanis, 2008). Entretanto, para o presente estudo, onde o objetivo maior seria reconhecer, validar critérios de positividade para oocistos, padronizar um inóculo e, secundariamente realizar um ensaio piloto na tentativa de visualizar oocistos em água reagente, esta metodologia não se mostraria eficaz por apresentar maior acurácia em matrizes que apresentam turbidez (Franco et al., 2001).

Entre os surtos de veiculação hídrica por *T. gondii*, devidamente documentados no mundo, considera-se o contato e ingestão acidental de águas recreacionais, uma importante via de aquisição da parasitose (Karanis et al., 2007; Jones e Dubey, 2010). Porém, o isolamento dos oocistos em diferentes matrizes hídricas, bem como, dados acerca da epidemiologia ambiental da real prevalência da protozoose em água, permanece desconhecido.

Os métodos de contaminação artificial para a detecção de *T. gondii* em água são frequentemente executados usando-se valores exorbitantes (10^4 , 10^5 oocistos) como inóculo, e empregam-se metodologias moleculares (Tabela 3) para recuperação de oocistos e investigação em amostras ambientais (Kourenti e Karanis, 2006, Sotiriadou e Karanis, 2008).

Entretanto, tais condições não condizem com as que ocorrem em situação natural de contaminação, visto que, um dos fatores limitantes para a detecção do protozoário em água, consiste no pequeno número de oocistos presentes em amostras ambientais (Dumètre e Dardé, 2003).

Características, como elevada turbidez, salinidade, pH, entre outros pode influenciar a recuperação destes oocistos (DaBritz et al, 2007; Verant et al., 2014).

O alto custo e o tempo requerido para se ter um diagnóstico confiável também adicionam dificuldade para a análise do protozoário em água (Dumètre e Dardé, 2003).

A reação de Imunofluorescência Direta, com anticorpos específicos direcionados aos epítomos das paredes de oocistos de *Toxoplasma gondii* não está comercialmente disponível. Porém, a triagem inicial da amostra pode ser feita pelo processamento da mesma através da filtração em membranas e a detecção mediante visualização de oocistos em microscopia de epifluorescência sob luz UV (Dumètre e Dardé, 2003) como efetuado no presente estudo.

Contudo, o reconhecimento de oocistos de *T. gondii* pode resultar em falso-positivo, devido à semelhança com outros coccídios não patogênicos para seres humanos, como *Hammondia* sp. e *Neospora* sp., que também exibem autofluorescência e, podem estar presentes em amostras ambientais (Verant et al., 2014). Ainda assim, o reconhecimento em microscopia de epifluorescência juntamente com a ficha de leitura produzida neste trabalho é uma importante ferramenta para um pré-*screening* em ocasiões de suspeita de surtos de toxoplasmose.

Ao se detectar estruturas denominadas como *Toxoplasma gondii* oocyst like, os seguintes passos para a confirmação do diagnóstico devem ser realizados: a reação em cadeia da polimerase (PCR) com amplificação de *primers* específicos ou mediante o bioensaio (modelos murinos) (Jones e Dubey, 2010).

Estas etapas são essenciais para a investigação da ocorrência de *T. gondii*, pois não existe regulamentação ou métodos validados para monitorar a presença de oocistos em água recreacional ou destinada ao consumo humano, sendo estas, as ferramentas mais fidedignas para confirmação da contaminação e aferição de infectividade (Isaac-Renton et al., 1998; Dumètre e Dardé, 2003 e 2007; Scwab et al., 2003; Villena et al., 2004).

Para aumentar a sensibilidade de detecção do protozoário em água, recomenda-se a combinação de diferentes metodologias (Tabela 3), entretanto, a PCR tem se mostrado a técnica preferencial para a detecção de oocistos de *T. gondii* em água, quando comparado ao bioensaio em camundongos, visto que proporciona redução do tempo de detecção de algumas semanas para 1-2 dias (Villena et al., 2004; Kourenti e Karanis, 2006; Sroka et al., 2007; Plutzer e Karanis, 2016).

Em atualização recente quanto aos surtos de veiculação hídrica ocasionados por protozoários patogênicos em escala mundial, verificou-se que no período de 2011 a 2016, em um curto período de tempo (5 anos), foram relatos 381 surtos, correspondendo a um aumento dos mesmos em nações desenvolvidas (Efstratiou et al., 2017). Destes, 63% foram ocasionados por espécies de *Cryptosporidium* e 37% por *Giardia duodenalis*. Nenhum surto por qualquer outro agente parasitário, inclusive *Toxoplasma gondii*, foi documentado no mundo no período mencionado (Efstratiou et al., 2017). Quase a metade destes surtos, (49%) ocorreram na Nova Zelândia, 41% na América do Norte e, 9% na Europa.

Pondera-se que este aumento do número de surtos e do número de casos, teria relação com as modificações nas legislações acerca do monitoramento de protozooses em água destinada ao consumo humano nos países desenvolvidos; em países como os Estados Unidos, por exemplo, a criptosporidiose é considerada doença de notificação obrigatória (USEPA, 2012). Entretanto, estes fatos não são realidade em regiões mais pobres do mundo, que carecem de sistemas eficientes de notificação e vigilância integrada – epidemiológica sanitária e ambiental – onde a verdadeira magnitude das protozooses de veiculação hídrica continuam negligenciadas e com escassez ou ausência de dados.

Por fim, suscita-se o questionamento se os casos de surtos de veiculação hídrica, por parasitos como *Toxoplasma gondii* e outros agentes etiológicos reportados menos frequentemente como causadores destes episódios são, na realidade, pouco frequentes, ou

pelo contrário, existe uma falta de atenção e de métodos rápidos, sensíveis e eficientes para recuperar estes tipos de parasitos em amostras ambientais.

7.1 CONCLUSÕES

- Levando em consideração a revisão bibliográfica, a padronização de um inóculo com oocistos de *Toxoplasma gondii* realizada refletiu a necessidade de utilizar um inóculo desafiador para representar situações mais reais, visto que a mesma foi executada com sucesso bem como o reconhecimento destas estruturas sob microscopia de epifluorescência.
- A caracterização morfológica dos oocistos forneceu subsídios para produção de uma ficha de coleta e leitura de amostras hídricas, onde ressalta-se critérios de positividade para confirmação de contaminação por oocistos de *T. gondii* em água.
- A metodologia utilizada proporcionou a recuperação dos oocistos inoculados artificialmente em água, ainda que com baixo índice de recuperação.
- A utilização de inóculos desafiadores (baixa concentração de oocistos) - conforme adotado neste estudo corrobora a recomendação encontrada na literatura, visto que, mesmo em situação de surtos de grandes proporções, a recuperação de oocistos do parasito em água é baixa, ou até mesmo nula.
- Novos estudos acerca do aprimoramento da metodologia devem ser realizados, com o intuito de melhorar a sensibilidade de recuperação de oocistos em água.
- Inexistem kits comerciais para a detecção do protozoário por Reação de Imunofluorescência Direta até o presente momento. Desta forma, a utilização de uma característica inerente aos oocistos do protozoário (capacidade de

exibir autofluorescência) em luz UV, atua como mais uma ferramenta para sua detecção em água.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA M J, OLIVEIRA L H H, FREIRE R L, NAVARRO I T. *Aspectos sociopolíticos da epidemia de toxoplasmose em Santa Isabel do Ivaí (PR)*. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16 (Supl. 1): 1363-1373. 2011.
- AMATO NETO V, E MARCHI, C R. Toxoplasmose. *In: CIMERMAN B, CIMERMAN, S. Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*. 2.ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 159-178. 2002.
- ARANTES T P, LOPES W D, FERREIRA R M, PIERONI J S, PINTO V M, SAKAMOTO C A, et al. *Toxoplasma gondii: evidence for the transmission by semen in dogs*. *Exp Parasitol*; 123:190–4. 2009.
- ASTHANA S P, MACPHERSON C N L, WEISS S H, STEPHENS R, DENNY T N, SHARMA R N, et al. *Seroprevalence of Toxoplasma gondii in pregnant women and cats in Grenada, West Indies*. *J Parasitol*; 92:644–5. 2006.
- AUBERT D, VILLENA I. *Detection of Toxoplasma gondii oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region*. France. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*; 104 (2): 290–295. 2009.
- BAHIA-OLIVEIRA L M, JONES J L, AZEVEDO-SILVA J, ALVES C.C, OREFICE F, ADDISS D.G. *Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil*. *Emerg Infec Dis*; 9:55–62.133. 2003.
- BALASUNDARAM MB, ANDAVAR R, PALANISWAMY M, VENKATAPATHY N. *Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients*. *Arch Ophthalmol*; 128:28–32. 2010.

BALDURSSON S, KARANIS P. *Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreak since update 2004 to 2010*. Water Res. 45 (20), 6603-6614. 2011.

BEN AYED L, YANG W, WIDMER G, CAMA V, ORTEGA Y, XIAO L. *Survey and genetic characterization of wastewater in Tunisia for Cryptosporidium spp., Giardia duodenalis, Enterocytozoon bienersi, Cyclospora cayetanensis and Eimeria spp.* Water Health; 10: 431-444. – <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2012.204>

BENENSON M W, TAKAFUJI E T, LEMON S M, GREENUP R L, SULZER A J. *Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water*. New Eng J Med; 307:666–9. 1982.

BRASIL, Portaria Nº 2.194 de 2011 do Ministério da Saúde.

BEVERLEY, J. K. A. *A new look at infectious diseases. Toxoplasmosis*. British Medical Journal, v. 2, n. 5864, p. 475-478. 1973.

BONAMETTI, A M et al. *Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding*. Journal of Tropical Pediatrics, v. 43, n. 2, p. 116. 1997.

BORCHARDT M A, SPENCER S K, BERTZ P D, WARE M W, DUBEY J P, ALAN LINDQUIST H D. *Concentrating Toxoplasma gondii and Cyclospora cayetanensis from surface water and drinking by continuous separation channel centrifugation*. Journal of Applied Microbiology; 107: 1089-97. [PubMed: 1948637]. 2009.

BORGES M, SILVA T M, BRITO C, TEIXEIRA N AND ROBERTS C W. *How does Toxoplasmosis affect the maternal-fetal immune interface and pregnancy?* Parasitol Immunol. 2018.

BOWIE WR, KING AS, WERKER DH, ISAAC-RENTON JL, BELL A, ENG SB, et al. *Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water*. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet*; 350:173–7. 1997.

CANTON, K M K; NASCIMENTO, G C; MOURA, L K B *et al.* O conhecimento de indivíduos adultos sobre toxoplasmose em uma população universitária. *Revista de Enfermagem UFPE, Recife*, v. 9, n. 10, p. 1445-1452, dez. 2015.

CARME B, BISSUEL F, AJZENBERG D, BOUYNE R, AZNAR C, DEMAR M, et al. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol*; 40:4037–44. 2002.

CARNEIRO A C AV et al. *Genetic characterization of Toxoplasma gondii revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil*. *Journal of Clinical Microbiology*; V 51(3) p. 901-907. 2013.

CAVALCANTE G T, AGUIAR D M, CAMARGO L M A, LABRUNA M B, DE ANDRADE H F, MEIRELES L R, et al. *Seroprevalence of Toxoplasma gondii antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil*. *J Parasitol*; 92:647–9. 2006.

CEVS, CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. *Investigação de surto de Toxoplasmose em Santa Maria/ RS*. Prefeitura Municipal de Santa Maria, 2018. Disponível em: <<http://www.santamaria.rs.gov.br/docs/noticia/2018/07/D13-1480.pdf>> Julho, 2018.

COLE R A, LINDSAY D S, HOWE D K, RODERICK C L, DUBEY J P, THOMAS N J et al. *Biological and molecular characterizations of Toxoplasma gondii strains obtained from Southern sea otters (Enhydra lutris nereis)*. *J Parasitol*; 86 (3): 526-530. 2000.

CONRAD P A, MILLER M A, KREUDER C, JAMES E R, MAZET J, DABRITZ H, JESSUP D A, GULLAND F, GRIGG M E. *Transmission of Toxoplasma: Clues from the study*

of sea otters as sentinels of Toxoplasma gondii flow into the marine environment. International Journal for Parasitology. 35: 1155–1168. 2005.

CDC (2014). *Outbreak of cryptosporidiosis among responders to a roll-over of a truck carrying calves – Kansas, April 2013.* Morb Mortal Wkly Rep; 63: 1185-1188.

DABRITZ H A, MILLER M A, ATWILL E R, GARDNER I A, LEUTENEGGER C M, MELLI A C, CONRAD P A. *Detection of Toxoplasma gondii-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden.* J Am Vet Med Assoc; 231:1676–1684. 2007.

DABRITZ H A, AND CONRAD P A. *Cats and Toxoplasma: implications for public health.* Zoon Pub Health; 57: 34-52. 2010.

DATTOLI V C, VEIGA R V, CUNHA S S, PONTES-DE-CARVALHO L, BARRETO M L, ALCANTARA-NEVES N M. *Oocyst ingestion as an important transmission route of Toxoplasma gondii in Brazilian urban children.* J Parasitol; 97:1080–4. 2011.

DAVIS T L, STANDRIDGE J H, DEGNAN A J. *Bacteriological analysis of indoor and outdoor water parks in Wisconsin.* J Water Health; 7(3):452-63. 2009.

DEMAR M, HOMMEL D, DJOSSOU F, PENEAU C, BOUKHARI R, LOUVEL D, et al. *Acute toxoplasmosis in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana.* Clin Microbiol Infect; 18: E221–31. 2012.

DE MOURA L, BAHIA-OLIVEIRA L M, WADA M Y, JONES J L, TUBOI S H, CARMO E H, RAMALHO W M, CAMARGO N J, TREVISAN R, GRAÇA R M, DA SILVA A J, MOURA I, DUBEY J P, GARRETT D O. *Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene.* Emerg Infect Dis 12: 326-329. 2006.

DUBEY, J P, MILLER, N AND FRENKEL, J K. *The toxoplasma gondii oocyst from cat feces.* J EXP MED 132, 636–662. 1970.

- DUBEY J P, AND BEATTIE C P. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988.
- DUBEY J P. *Duration of immunity to shedding of Toxoplasma gondii oocysts by cats*. Journal of Parasitology; 81: 410-415. 1995.
- DUBEY J P, JENKINS M C, THAYER D W, KWOK O C AND KHEN S K. *Killing of Toxoplasma gondii oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts*. J Parasitol; 82: 724-727. 1996.
- DUBEY J P. *Toxoplasma gondii oocyst survival under defined temperatures*. J. Parasitol; 84: 862–865. 1998.
- DUBEY J P, LINDSAY D S, SPEER C A. *Structures of Toxoplasma gondii Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts*. Clin Microbiol Ver; 11(2):267–299. 1998.
- DUBEY J P, GAMBLE H R, HILL D, SREEKUMAR C, ROMAND S, THULLIEZ P. *High prevalence of viable Toxoplasma gondii infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts*. J Parasitol; 88:1234–1238. 2002.
- DUBEY, J.P. *Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis*. Vet Parasitol 126, 57–72. 2004.
- DUBEY JP, NAVARRO IT, SREEKUMAR C. *Toxoplasma gondii infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates*. J Parasitol; 90(4): 721-726. 2004.
- DUBEY J P, AND LINDSAY D. *Opportunistic infections: Toxoplasma, Sarcocysts and Microsporidia*. World Class Parasites: Volume 9. Kluwer Academic Publishers. 2004.

- DUBEY J P et al. *Prevalence of viable Toxoplasma gondii in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers*. J Parasitol; 91: 1082-93. 2005.
- DUBEY J P, JONES JL. *Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States*. Inter J Parasitol; 38:1257–78. 2008.
- DUBEY J P. *The History of Toxoplasma gondii—The First 100 Years*. J Eukaryot Microbiol; 55(6): 467-75. 2008.
- DUBEY J P, AND SU C. *Population biology of Toxoplasma gondii: what's out and where did they come from*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104: 190-195. 2009.
- DUBEY J P. (ed.) *In Toxoplasmosis of Animals and Humans*, CRC Press. 2010.
- DUBEY JP, HOTEA I, OLARIU TR, JONES JL, DĂRĂBUȘ G. *Epidemiological review of toxoplasmosis in humans and animals in Romania*. Parasitology; 141(3): 311-25. 2014.
- DUBEY J P, VERMA S K, FERREIRA L R, OLIVEIRA S, CASSINELLI A B, YING Y, KWOK O C, TUO W, CHIESA O A, JONES J L. *Detection and survival of Toxoplasma gondii in milk and cheese from experimentally infected goats*. J Food Prot; 77(10):1747-53. 2014.
- DUMÈTRE A AND DARDÉ, M L. *How to detect Toxoplasma gondii oocysts in environmental samples?* FEMS Microbiol Rev 27: 651-661. 2003.
- DUMÈTRE, A AND DARDÉ, M L. *Purification of Toxoplasma gondii oocysts by cesium chloride gradient*. J Microbiol Methods 56, 427–430. 2004.

DUMÈTRE, A AND DARDÉ, M.L. *Immunomagnetic separation of Toxoplasma gondii oocysts using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall.* J Microbiol Methods 61, 209–217. 2005.

DUMÈTRE, A AND DARDÉ, M L. *Detection of Toxoplasma gondii in water by Immunomagnetic separation method targeting the sporocysts.* Parasitol Res; 101 (4): 989-96. 2007.

DUNN D, WALLON M, PEYRON F, PETERSEN E, PECKHAM C, GILBERT R. *Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling.* Lancet; 353:1829–33. [PubMed: 10359407]. 1999.

EFSTRATIOU A, ONGERTH E J, KARANIS P. *Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011 e 2016.* Water Research. 114: 14-22. 2017.

EL-SALAM MM. *Assessment of water quality of some swimming pools: a case study in Alexandria, Egypt.* Environ Monit Assess; 184: 7395-7406. 2012.

ERLUG S, OKYAY P, TURKMEN M, YUKSEL H. *Seroprevalence and risk factors for Toxoplasma infection among pregnant women in Aydin province, Turkey.* BMC Public Health; 5:66. 2005.

FAYER R, DUBEY J P, LINDSAY D S. *Zoonotic protozoa: from land to sea.* Trends Parasitol; 20 (11): 531-536. 2004.

FIGUERAS M J, AND BORREGO J J. *New perspectives in monitoring drinking water microbial quality.* Int J Environ Res Public Health 7 (12): 4179-4202. (2010).

FLETCHER S M, STARK D, HARKNESS J, ELLIS J. *Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective.* Clin Microbiol Rev. 2012; 25: 420-449.

- FRANCO R M B, ROCHA-EBERHARDT R, CANTUSIO-NETO R. *Occurrence of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2001; 43(2): 109-111. 2001.
- FRENKEL J K, DUBEY J P. *Toxoplasmosis and its prevention in cats and man*. J Infect Dis; 126: 664–673. 1972.
- FRENKEL J K, AND DUBEY J P, *Effects of freezin on the viability of Toxoplasma oocysts*. Journal of Parasitology: 59: 587-8. [PubMed: 4711675]. 1973
- FRENKEL J K, DUBEY J P. *Hammondia hammondi: A new coccidium of cats producing cysts in muscle of other mammals*. Science; 189(4198): 222–224. 1975.
- HEUKELBACH J, MEYER-CIRKEL V, MOURA RCS, GOMIDE M, QUEIROZ JAN, SAWELJEW P, et al. *Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil*. Emerg Infect Dis; 13:287–9. 2007.
- HILL D, AND DUBEY J.P. *Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention*. Clin Microbiol Infect; 8(10):634-40. 2002.
- HOMAN WL, VERCAMMEN J, DE BRAEKELEER, VERSCHUEREN H. *Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in Toxoplasma gondii, and its use for diagnostic an quantitative PCR*. Int J Parasitol. 2000; 30:69–75.
- HUNG CC, FAN CK, SU KE, SUNG FC, CHIOU HY, GIL V, et al. *Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe*. Trans R Soc Trop Med Hyg; 101:134–9. 2007.
- ISSAC-RENTON J, BOWIE W R, KING A, IRWIN G S, ONG C S, FUNG CP et al. *Detection of Toxoplasma gondii oocyst in drinking water*. Applied and Environment Microbiology; 64: 2278-80. 1998.

JONES, J. L. *et al.* Congenital Toxoplasmosis: A Review. *Obstetrical and gynecological Survey*. V. 56, n. 5, p. 296-305. 2001.

JONES JL, LOPEZ B, MURY MA, WILSON M, KLEIN R, LUBY S, *et al.* Toxoplasma gondii infection in rural Guatemalan children. *Am J Trop Med Hyg*; 72: 295–300. 2005.

JONES J, DUBEY J. *Waterborne toxoplasmosis – recent developments*. *Exp Parasitol*; 124:10–25. 2010.

KARANIS P, KOURENTI C, SMITH H. *Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt*. *J. Water Health* 5 (1), 1-38. 2007.

KARANIS P, ALDEYARBI H, MIRHASHEMI M, KHALIL K. *The impact of the waterborne transmission of Toxoplasma gondii and analysis efforts for water detection: an overview and update*. *Environmental Science and Pollution Research* 20:86–9. (2013)

KHAN A, JORDAN C, MUCCIOLI C, VALLOCHI A, RIZZO L, BELFORT R, SIBLEY LD. *Genetic divergence of Toxoplasma gondii strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil*. *Emerg Infect Dis*;12 (6): 942–949. 2006.

KOURENTI C, HECKEROTH A, TENTER A, KARANIS. *Development and application of different methods for the detection of Toxoplasma gondii in water*. *Appl Environ Microbiol* 69: 102-106. 2003.

KOURENTI, C, AND KARANIS, P. *Development of a sensitive polymerase chain reaction method for the detection of Toxoplasma gondii in water*. *Water Sci Technol* 50, 287–291. 2004.

KOURENTI C, AND KARANIS P. *Evaluation and applicability of a purification method coupled with nested PCR for the detection of Toxoplasma oocysts in water*. *Lett Appl Microbiol*; 43:475–481. 2006.

- KHURANA S, BATRA N. *Toxoplasmosis in organ transplant recipients: Evaluation, implication, and prevention*. Trop Parasitol; 6(2):123–128. 2016.
- KUTICIC V AND WIKERHAUSER T. *Studies of the effect of various treatments on the viability of Toxoplasma gondii tissue cysts and oocysts*. Curr. Trop Microbiol Immunol; 219: 261-265. 1996.
- LEAL D A G *et al.* Genotypic characterization and assessment of infectivity of human waterborne pathogens recovered from oysters and estuarine waters in Brazil. Water Research 137 (2018) 273 e 280.
- LINDSAY DS, DUBEY JP. *Long-term survival of Toxoplasma gondii sporulated oocysts in seawater*. J Parasitol; 95: 1019–1020. 2009.
- LINDSAY D S, BLAGBURN B L AND DUBEY J P. *Survival of nonsporulated Toxoplasma gondii oocysts under refrigerator conditions*. Vet. Parasitol; 103: 309-313. 2002.
- MAHDY MA, ALAREQI LM, ABDUL-GHANI R, AL-ERYANI SM, AL-MIKHLAFY AA, AL-MEKHLAFI AM, ALKARSHY F, MAHMUD R. *A community-based survey of Toxoplasma gondii infection among pregnant women in rural areas of Taiz governorate, Yemen: the risk of waterborne transmission*. Infect Dis Poverty; 6(1): 26. 2017.
- MARTINEZ SANCHEZ R, MACHIN SANCHEZ R, FACHADO CARVAJALES A, PIVIDAL GRANA J, CRUZ DE LA PAZ R, SUAREZ HERNANDEZ M. *Several results of a Toxoplasma survey*. Invest Clin; 32:13–26. 1991.
- MILLER M A, MILLER W A, CONRAD P A, JAMES E R, MELLI A C, LEUTENEGGER *et al.* *Type X Toxoplasma gondii in a wild mussel and terrestrial carnivores form coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters*. Int J Parasitol; 38 (11): 1319-1328. (2008).

- MESSIER V, LEVESQUE B, PROULX JF, ROCHETTE L, LIBMAN MD, WARD BJ, et al. *Seroprevalence of Toxoplasma gondii among Nunavik Inuit (Canada)*. Zoonoses Public Health; 56:188–97. 2009.
- MITSUKÓ-BREGANÓ et al. *Toxoplasmose adquirida na gestação congênita; vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas*. 1 ed. rev. e atual. Londrina: Eduel: Campus, 2010.
- MINEO E VITOR. *Parasitologia Humana*. 13 ed. rev. e atual. Cap. 16. Atheneu. 2018.
- NISSAPATORN V, SUWANRATH C, SAWANGJAROEN N, LING LY, CHANDEYING V. *Toxoplasmosis-serological evidence and associated risk factors among pregnant women in Southern Thailand*. Am J Trop Med Hyg; 85: 243–7. 2011.
- PALANISAMY M, MADHAVAN B, BALASUNDARAM MB, ANDAVAR R, VENKATAPATHY N. *Outbreak of ocular toxoplasmosis in Coimbatore, India*. Indian J Ophthalmol; 54:129–31. 2006.
- PENA H F; GENNARI S M; DUBEY J P; SU C. *Population structure and mouse-virulence of Toxoplasma gondii in Brazil*. Int J Parasitol, v.38, p.561-569, 2008.
- PEREIRA K S, FRANCO R M B, LEAL D A G. *Transmission of Toxoplasmosis (Toxoplasma gondii) by Foods*. Advances in food and nutrition research. 2010.
- PINEDA C O. *Parasitas em amostras de água de piscinas e em hortaliças: Desafios de detecção por métodos parasitológicos ou moleculares*. 2017. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 2017.
- PLUTZER J, KARANIS P. *Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water*. Water Res. 101:318-332. 2016.
- SILVEIRA CAM. *Toxoplasmose: dúvidas e controvérsias*. Erechim, Brazil : Edifapes. 2002.

ROSE J B, HUFFMAN D E, AND GENNECCARO A. *Risk and control of waterborne cryptosporidiosis*, FEMS Microbiol; Rev. 26: 113-123. 2002.

SOTIRIADOU I, AND KARANIS P. *Evaluation of loop-mediated isothermal for detection of Toxoplasma gondii in water samples and comparative findings pu polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT)*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease; 62: 357-65. [PubMed: 18715739]. 2008.

ROSADO-GARCÍA FM, GUERRERO-FLÓREZ M, KARANIS G, HINOJOSA MC, KARANIS P. Water-borne protozoa parasites: The Latin American perspective. Int J Hyg Environ Health; pii: S1438-4639(17):30016-0. 2017.

SINGH G, AND SEHGAL R. *Transfusion-transmitted parasitic infections*. Asian J Transfus Sci, v. 4(2), p. 73–77. 2010.

SCHWAB, K. J. AND MCDEVITT, J J. *Development of a PCR enzyme immunoassay oligoprobe detection method for Toxoplasma gondii oocysts, incorporating PCR controls*. Appl Environ Microbiol 69, 5819–5825. 2003.

SOUZA D S M, RAMOS A P D, NUNES F F, MORESCO V, TANIGUCHI S, GUIGUET LEAL D A, SASAKI S T, BÍCEGO M C, MONTONE R C, DURIGAN M, TEIXEIRA A L, PILOTTO M R, DELFINO N, FRANCO R MB, MELO CMR, BAINY ACD, BARARDI CRM. *Evaluation of Tropical Water Sources and Mollusks in Southern Brazil using Microbiological, Biochemical and Chemical Parameters*. Ecotoxicol Environ Saf; 76:153-161. 2012.

SHAPIRO K, MAZET J A, SCHRIEWER A, WUERTZ S, FRITZ H, MILLER W A, LARGIER J, CONRAD P A. *Detection of Toxoplasma gondii oocysts and surrogate microspheres in water using ultrafiltration and capsule filtration*. Water Res. 44: 893-903. 2010.

- SROKA J, WOJCIK-FATLA A, DUTKIEWICZ J. *Occurrence of Toxoplasma gondii in water from wells located on farms*. Ann Agric Environ Med; 1:169–75. 2006.
- SROKA S, BARTELHEIMER N, WINTER A, HEUKELBACH J, ARIZA L, RIBEIRO H, et al. *Prevalence and risk factors of toxoplasmosis among pregnant women in Fortaleza, Northeastern Brazil*. Am J Trop Med Hyg; 83: 528–33. 2010.
- TENTER A M, HECKEROTH A R, WEISS L M. *Toxoplasma gondii: from animals to humans*. Int. J. Parasitol. 30: 1217–1258. 2000.
- USEPA. Method EPA 1623.1: Cryptosporidium and Giardia in water by Filtration/IMS/FA. Office of Water. EPA 816-R-12-001. 2011.
- VANWORMER E, FRITZ H, SHAPIRO K, MAZET J A, CONRAD P A. *Molecules to modeling: Toxoplasma gondii oocysts at the human-animal-environment interface*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis; 36(3):217-31. 2013.
- VAUDAUX J D, MUCCIOLI C, JAMES E R, SILVEIRA C, MAGARGAL S L, JUNG C, DUBEY J P, JONES JL, DOYMAZ MZ, BRUCKNER D A, BELFORT R J R, HOLLAND G N, GRIGG M E. *Identification of an atypical strain of Toxoplasma gondii as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil*. J Infect Dis; 202(8):1226-33. 2010.
- VERANT M L, d'OZOUVILLE N, PARKER P G, SHAPIRO K, VANWORMER E, AND DEEM S L. *Attempted detection of Toxoplasma gondii oocysts in environmental waters using a simple approach to evaluate the potential for waterborne transmission in the Galápagos Islands, Ecuador*. Ecohealth; 11: 207-214. 2014.
- VILLENA, I, AUBERT, D, GOMIS, P, FERTE, H, INGLARD, J C, DENIS-BISIAUX, H, DONDON, J M, PISANO, E, ET AL. *Evaluation of a strategy for Toxoplasma gondii oocyst detection in water*. Appl Environ Microbiol 70, 4035–4039. 2004.

- WAINWRIGHT K E, LAGUNAS-SOLAR M, MILLER M A, BARR B C, GARDNER I A, PINA C, MELLI A C, PACKHAM A E, ZENG N, TRUONG T, CONRAD P A. *Physical inactivation of Toxoplasma gondii oocysts in water*. Appl Environ Microbiol; 73: 5663–5666. 2007.
- WARE M W, AGUSTINE S A J, ERISMAN D O, SEE M J, WYMER L, HAYES S L, DUBEY J P AND VILLEGAS E N. *Determining UV inactivation of Toxoplasma gondii oocysts by using cell culture and mouse bioassay*. Applied and Environmental Microbiology; V. 76 (15); p. 5140-5147. 2010.
- WEISS L M, AND DUBEY J P. *Toxoplasmosis: a history of clinical observations*. Int J Parasitol; 39(8): 895-901. 2009.
- WILSON, C B et al. *Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital Toxoplasma infection*. Pediatrics, v. 66, p. 767-774. 1980.
- YANG W, LINDQUIST H D, CAMA V, SCHAEFER F W, VILLEGAS E, FAYER R, LEWIS E J, FENG Y, XIAO L. *Detection of Toxoplasma gondii oocysts in water sample concentrates by real-time PCR*. Appl Environ Microbiol; 75 (11): 3477-3483. 2009.

**APÊNDICE 1 – FICHA DE COLETA E LEITURA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS
PARA PESQUISA DE OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM ÁGUA**

PESQUISA DE OOCISTOS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EM ÁGUA	
Local da coleta:	
Data da coleta:	Observações:
Fatores abióticos mensurados	
Temperatura:	Salinidade:
pH:	Turbidez
Volume coletado:	Volume do sedimento:
Volume filtrado:	

CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE PARA OOCISTOS DE <i>Toxoplasma gondii</i>			
Filtro: LUZ UV			
1. Tipo de oocisto			
Esporulado	()	Nº de Esporocistos	1 () 2 ()
Não esporulado	()		
2. Padrão de fluorescência			
a- Típico	()	Atípico	()
Características:			
• <i>Pale White blue</i> (Azul esbranquiçado)	()	Azul escuro	()
• Azul neon	()	Azul opaco	()
Predominância de Fluorescência			
• Na parede dos oocistos	()		
• Na parede dos esporocistos	()		

