

**MÉTODOS DE DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *TOXOPLASMA GONDII*
EM AMOSTRAS DE ÁGUA**

Marlusa Nascimento Silva¹

Natália Canal²

¹Biomédica, Escola de Saúde Pública do Rio Grande do Sul;
marlusasilva@outlook.com.br

² Bióloga, Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul; natalia-canal@saude.rs.gov.br

Métodos de detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de água

RESUMO: O *Toxoplasma gondii* é o agente causador de uma das protozoonoses mais numerosamente distribuídas entre os países. A ocorrência de surtos de toxoplasmose no Brasil, relacionados à contaminação ambiental tem ganhado notoriedade com episódios recorrentes de grandes proporções. O enfrentamento desta problemática requer o aprimoramento e padronização de métodos de identificação ambiental de *T. gondii*. As técnicas disponíveis para a detecção ambiental de oocistos apresentam grande variabilidade e baixa reprodutibilidade. O presente trabalho tem como objetivo descrever os diferentes métodos disponíveis para detecção de *T. gondii* em amostras de água, explorando suas vantagens, desvantagens e limitações. A filtração foi destacada como método mais eficaz no processamento de amostras turvas, com custo-benefício variável à escolha de sistemas. A ausência de anticorpos monoclonais dificulta desenvolvimento da separação imunomagnética na purificação. A detecção molecular por PCR é amplamente utilizada na amplificação do gene B1. Entretanto, além da identificação, a infectividade dos oocistos é primordial para a compreensão do risco da presença do *T. gondii* em ambiente hídrico, podendo ser mensurado através de bioensaios. Considerando que, nenhuma das metodologias disponíveis está isento de limitações, o desafio está colocado às portas da saúde pública do país que protagonizou o maior surto de toxoplasmose do mundo.

Palavras-chave: Toxoplasmose. Detecção. Água.

METHODS OF DETECTION THE OOCYST TOXOPLASMA GONDII IN WATER SAMPLE

ABSTRACT: Toxoplasma or the causative agent of one of the protozoonoses distributes numerous among the countries. The occurrence of toxoplasmosis outbreaks in Brazil, related to environmental contamination, has gained notoriety with recurring large proportions. Facing this problem requires the improvement and standardization of methods of environmental identification of T.gondii. The techniques available for environmental detection of oocysts have great variability and low reproducibility. The present work aims to describe the different methods available to detect T. gondii in water samples, exploring its advantages, disadvantages and advantages. Filtration was highlighted as the most effective method for processing turbid water, with variable cost-benefit to choose the systems. The absence of monoclonal antibody makes it difficult to develop immunomagnetic separation in purification. Molecular detection by PCR is widely used in the amplification of the B1 gene. However, in addition to identification, the infectivity of oocysts is essential for understanding the risk of the presence of T. gondii in the water environment, which can be measured through bioassays. That, none of the available methodologies is exempt from limitations, or the challenge is placed on the doorstep of public health in the country that led or was the biggest outbreak of toxoplasmosis in the world.

Keywords: Toxoplasmosis. Detection. Water.

**MÉTODOS DE DETECCIÓN DE OOCISTOS DE *TOXOPLASMA GONDII* EM MUESTRAS
DE AGUA**

RESUMEN: O *Toxoplasma gondii* es el agente causante de una de las protozoonosis que se distribuyen más ampliamente entre los países. La aparición de brotes de toxoplasmosis en Brasil, relacionados con la contaminación ambiental, ha

ganado notoriedad con episodios recurrentes de grandes proporciones. Enfrentar este problema requiere la mejora y estandarización de los métodos de identificación ambiental de *T.gondii*. Las técnicas disponibles para la detección ambiental de ooquistes tienen gran variabilidad y baja reproducibilidad. El presente trabajo tiene como objetivo describir los diferentes métodos disponibles para la detección de *T. gondii* en muestras de agua, explorando sus ventajas, desventajas y limitaciones. La filtración se destacó como el método más efectivo para procesar muestras turbias, con una relación costo-beneficio variable para la elección de los sistemas. La ausencia de anticuerpos monoclonales dificulta el desarrollo de la separación inmunomagnética en la purificación. La detección molecular por PCR se usa ampliamente en la amplificación del gen B1. Sin embargo, además de la identificación, la infectividad de los ooquistes es esencial para comprender el riesgo de la presencia de *T. gondii* en un entorno acuático, que puede medirse mediante bioensayos. Teniendo en cuenta que ninguna de las metodologías disponibles está exenta de limitaciones, el desafío se encuentra a las puertas de la salud pública en el país que lideró el mayor brote de toxoplasmosis en el mundo.

Palabras clave: Toxoplasmosis. Detección. Agua

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é o agente causador de uma das protozoonoses mais numerosamente distribuídas entre os países. Estima-se que um terço, ou mais, da população mundial apresente anticorpos contra o parasita¹. Este, tem adquirido progressiva relevância desde a sua descoberta em roedores em 1908, na Tunísia, África. Assim, a toxoplasmose passou a ser compreendida como um desafio para a saúde das populações devido à importância da infecção na medicina humana e veterinária sendo uma das zoonoses mais comuns em todo o mundo².

Em 1970, foi elucidado o ciclo de vida desse protozoário, que apresenta uma fase sexuada que se dá nos felídeos considerados hospedeiros definitivos e uma fase assexuada que ocorre nos felídeos e nos hospedeiros intermediários como mamíferos e aves³. Existem três formas infecciosas de *T. gondii*: os taquizoítos, os bradizoítos e os esporozoítos protegidos no interior de um oocisto⁴. No ambiente, os oocistos podem sobreviver durante vários anos sob condições de temperatura e umidade adequadas, dispersando-se através da água e do solo⁵. Na água, podem permanecer infecciosos por pelo menos 54 meses, no solo, podem tolerar variações de temperatura por aproximadamente 18 meses⁵. Tais fontes, são provavelmente responsáveis por uma parte significativa de infecções em animais que podem ser posteriormente consumidos por humanos⁶. Os humanos são infectados principalmente pela ingestão de cistos de bradizoítos em carne mal cozida de hospedeiros intermediários infectados (porco e ovelhas), ou ingestão de oocistos esporulados através do consumo de água ou verduras e hortaliças contaminadas⁷.

Em 1927, o Brasil relatou um caso de toxoplasmose humana no Rio de Janeiro e desde então, o cenário epidemiológico da toxoplasmose têm apresentado novos episódios em várias regiões do país ao longo dos anos⁹. Diversos surtos ocasionados pela ingestão de água contaminada por oocistos de *T. gondii* foram identificados. As infecções estão mundialmente distribuídas, especialmente na Europa, América do Sul, América Central e África⁸. O primeiro surto no Brasil foi descrito Bragança-SP em 1967. Devido ao desconhecimento das características etiológicas e epidemiológicas do patógeno neste período, a investigação resultou em desfecho inconclusivo a respeito das fontes de

contaminação¹⁰. O maior surto de toxoplasmose registrado até 2001, teve comprovada veiculação hídrica. Este, ocorreu em Santa Isabel do Ivaí (Paraná), tendo como fonte de contaminação, o reservatório de água contendo fezes de gatos¹⁰.

⁹Ocorre variada prevalência no contexto global, que pode ser percebida em análises regionais. A região sul do país, tem se destacado com taxas que variam de 70% a 80%, estas, justificadas por questões relacionadas ao saneamento e hábitos alimentares de consumo de carne malcozida¹¹. Esta realidade epidemiológica, contrasta com as diversas ocorrências que tornaram o Brasil, o país que registrou o maior surto de toxoplasmose do mundo. Este episódio ocorreu no ano de 2018, na região sul em Santa Maria (RS), neste período aproximadamente 2.000 casos foram notificados até outubro do mesmo ano, tendo como principal suspeita, a veiculação hídrica ou alimentar¹².

Considerando, os elementos ambientais como importantes propagadores do patógeno, a disponibilidade de métodos de identificação ambiental, tornou-se o ponto central da discussão sobre o manejo laboratorial dos casos. As técnicas disponíveis para a detecção oocistos em suprimentos de águas estão sujeitas à grande variabilidade e baixa reprodutibilidade¹³. Convencionalmente, o processamento de amostras ambientais é realizado em três etapas: coleta e concentração, purificação e identificação/ enumeração¹³. Entretanto, as limitações aumentam proporcionalmente, em relação ao aumento da turbidez, mesmo quando empregado o método de referência para pesquisa de *Cryptosporidium e Giardia*¹³.

Diante do exposto, este trabalho se justifica na necessidade da ampla disseminação de informações que levistem esta temática no país que protagonizou o maior surto de toxoplasmose do mundo, em 2018. Sobretudo, trazendo à luz a disponibilidade de recursos metodológicos que auxiliem na determinação ambiental do protozoário, visando contribuir com alternativas estratégicas para a rede de laboratórios de saúde pública. Desta forma, o objetivo deste estudo é descrever as metodologias disponíveis para a detecção de *T. gondii* em amostras de água, bem como, sintetizar suas vantagens, desvantagens e limitações.

2. METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão bibliográfica narrativa.

Dessa forma, a revisão foi construída dentro dos critérios que derivam basicamente, de análise da literatura publicada em livros, artigos de revista físicas e/ou eletrônicas a serem submetidas a interpretação e análise crítica do autor. Não possui critério sistemático para a busca e análise crítica das evidências e não exigem protocolo rígido¹⁴. A busca bibliográfica exploratória foi feita nas bases MEDLINE/PubMed/ScienceDirect/Scielo. Os critérios de exclusão aplicados foram: (i) texto completo indisponível; (ii) textos não relacionados com metodologia de detecção de oocistos de

T. gondii em amostras de água e (iii) artigos não experimentais. Os critérios de inclusão foram: conter as expressões de busca no título ou palavras-chave, e resumo com conteúdo relacionado ao objeto de busca. Aplicando-se os critérios pré- estabelecidos, foram selecionados 58 artigos para a leitura do resumo. Destes, 38 foram excluídos em virtude de atenderem aos critérios de exclusão.

3. RESULTADOS

Os artigos selecionados, foram explorados segundo suas principais contribuições e descritos na (TAB.1).

TABELA 1: Síntese dos principais métodos para detecção de *T.gondii* em amostras de águas

AUTOR	ANO	MÉTODO	PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES
KOURENTI	2003	CONCENTRAÇÃO CENTRIFUGAÇÃO FLOCULAÇÃO BIOENSAIO	O estudo demonstrou que a utilização dos floculantes de sulfato férrico e de alumínio foram mais eficazes que o carbonato de cálcio. A floculação foi mais eficiente quando comparada a centrifugação, na recuperação. Entretanto, os oocistos esporulados recuperados por centrifugação mantiveram a infecciosidade, que foi confirmada pela soroconversão de todos os camundongos.
SCHWAB; McDEVITT	2003	DETECÇÃO PCR – EIA	O método PCR em combinação com a hibridização com oligoprobe, foi utilizado a fim de aumentar a especificidade do método em amostras de água. A técnica forneceu resultados positivos em menos de 1 dia, sendo capaz de detectar menos de 50 oocistos.
VILLENA	2004	DETECÇÃO PCR BIOENSAIO	O estudo identificou uma taxa de detecção por PCR de 60% para 01 oocisto/L e 100% para 10 oocistos/L, sendo este considerado mais sensível que o bioensaio. A utilização do PCRBSA reduziu a incidência de inibidores de 38% para 10%. Ressalta-se a necessidade de desenvolvimento de um método quantitativo de transcrição reversa PCR na diferenciação de oocistos viáveis.
KOURENTI	2006	CONCENTRAÇÃO/ DETECÇÃO FLOCULAÇÃO PCR	O método de concentração por floculação apresentou altas taxas de recuperação de oocistos em águas de diferentes fontes. Foi considerado mais apropriado, devido à ausência da etapa de eluição necessária no método de filtração. A purificação por gradiente de Sheather, resultou em recuperações melhores em oocistos esporulados variando de 79/100%.

TABELA 1: Síntese dos principais métodos para detecção de *T.gondii* em amostras de águas

(Continua)

DUMÉTRE; DARDÉ	2007	DETECÇÃO IMS	O método IMS-4B6 direto foi desenvolvido para melhorar a detecção de <i>T. gondii</i> em água em detrimento do método IMS-3G4 indireto. O anticorpo 4B6 demonstrou-se útil na identificação de esporozoítos de diferentes genótipos de toxoplasma. Apresentou desvantagens significativas de reações cruzadas com esporocistos de <i>H. hammondi</i> , <i>H. heydorni</i> e <i>N. caninum</i> . Devendo-se utilizar o PCR para identificação definitiva.
SOTIRIADOU; KARANIS	2008	DETECÇÃO LAMP PCR	O método de LAMP, foi o mais eficiente na detecção das regiões genômicas B1 e TgOWP do <i>T.gondii</i> . Em 52 amostras de diferentes regiões geográficas, 25 (48%) foram positivas para o toxoplasma por meio do método LAMP, 7 (13,5%) por PCR, e todas negativas para IFT. O LAMP apresentou resultados altamente específicos para DNAs heterólogos extraídos de taquizoítos e oocistos de três cepas diferentes do <i>T. gondii</i> .
AUBERT; VILLENA	2009	DETECÇÃO PCR BIOENSAIO	De 482 amostras de água coletadas, 37 foram positivas para <i>T.gondii</i> por PCR. Entretanto, nenhuma destas foram positivas no bioensaio após esporulação, sugerindo ausência de infecciosidade. Neste estudo a sensibilidade do PCR variou de 1 oocisto/L a 1000 oocistos/L, de acordo com fonte de água semeada.
BORCHARDT	2009	CONCENTRAÇÃO CENTRIFUGAÇÃO CONTÍNUA	O método de centrifugação contínua de canais de separação, apresentou recuperação de 60% ou mais dos oocistos, em água potável e superficial. Entretanto, a recuperação foi menor em amostras de elevada turbidez. A ausência de filtros impede entupimento com perda do microorganismos alvo, sendo considerado um método promissor.
SHAPIRO	2010	CONCENTRAÇÃO	

		ULTRAFILTRAÇÃO FILTRAÇÃO EM CÁPSULA	A ultrafiltração e filtração de capsulas seguidas de análise microscópica, permitiram a detecção quantitativa de <i>T. gondii</i> em amostras de água potável e ambiental. A utilização da cápsula de filtragem aumentou a capacidade de detecção.
--	--	--	---

TABELA 1: Síntese dos principais métodos para detecção de *T.gondii* em amostras de águas

(Continua)

YANG	2009	DETECÇÃO q-PCR	O método q-PCR foi mais sensível na detecção do elemento de repetição 529pb em relação ao gene B1, na identificação de <i>T. gondii</i> em amostras de água de superfície.
LINDEMANN	2012	DETECÇÃO LAMP (PCR)	O LAMP, foi utilizado na detecção de <i>T. gondii</i> em amostras de águas residuais de efluentes de estações de tratamento, apresentando resultados satisfatórios. O desenvolvimento de um protocolo específico para o LAMP, projetado para amplificar DNA de toxoplasma busca obter rendimento superior ao PCR.
MARANGI	2015	DETECÇÃO q-PCR/HRM	O q-PCR multiplex possibilitou a detecção quantitativa simultânea de <i>G.duodenalis</i> , <i>Cryptosporidium</i> e <i>T.gondii</i> . Afirma-se que este ensaio seja uma ferramenta útil na quantificação de tais protozoários em diversas matrizes biológicas e ambientais.
WELLS	2015	DETECÇÃO q-PCR, <i>nested</i> -PCR)	O q-PCR apresentou maior sensibilidade na detecção do fragmento 529pb. A identificação do fragmento ITS1 por n-PCR necessitou maior concentração de DNA alvo para produzir resultados positivos.
SUAREZ	2016	CONCENTRAÇÃO FORMALINA/ÉTER	Entre os protozoários patogênicos <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> e <i>T.gondii</i> , o toxoplasma obteve a maior taxa de recuperação (76 a 90%) através do método de concentração por formalina/ éter em amostras de água de consumo humano. Acredita-se,

			que a aplicação do método pode ser útil na investigação de protozoários, por países com recursos limitados, considerando o baixo custo de sua execução e eficácia satisfatória.
HARITO	2017	CONCENTRAÇÃO LMS CENTRIFUGAÇÃO	A LMS forneceu resultados superiores a centrifugação, mesmo em baixas concentrações de oocistos e amostras com presença de detritos. De acordo com as propriedades de ligação da LMS aos oocistos, pode-se sugerir o desenvolvimento de uma separação imunomagnética de lecitina.

TABELA 1: Síntese dos principais métodos para detecção de *T.gondii* em amostras de águas

(Continua)

MORENO	2018	DETECÇÃO q-PCR	O sequenciamento de rRNA 18s, demonstrou ser um método eficaz e sensível para o estudo da diversidade eucariótica. A técnica foi projetada para a detecção de protozoários, utilizando um recurso bioinformático específico de alto rendimento na recuperação de sequências de <i>Giardia</i> , <i>Acanthamoeba</i> , <i>Blastocytis</i> , <i>Toxoplasma</i> e <i>Entamoeba</i> , em águas de irrigação de superfície. Sugere-se que, para comprovação da efetividade do método, um maior número de amostras sejam analisadas.
WU	2017	DETECÇÃO LF-RPA <i>nested</i> -PCR	O LF-RPA demonstrou sensibilidade 10 vezes maior quando comparado ao <i>nested</i> -PCR. Foi detectado o gene B1 do <i>T.gondii</i> ao limite de 0,1 oocistos/reação, enquanto o <i>nested</i> -PCR ao limite de 1 oocisto/reação. O método se mostrou suficientemente tolerante aos inibidores existentes no ambiente, com vantagens significativas de manuseio, rapidez e custo-efetividade. Acredita-se que o LF-RPA apresenta maior eficiência, e é mais adequado para a detecção de campo do que o PCR convencional.
ADAMSKA. M	2018	DETECÇÃO	A presença de <i>T.gondii</i> foi detectada em 19,4% das amostras obtidas de corpos de água poloneses, utilizando o sequenciamento do gene B1. Ressalta-se que os resultados obtidos representam uma ameaça para

		<i>nested</i> -PCR	a saúde pública, pois são utilizadas como locais de banho, podendo ocorrer consumo ocasional.
GALVANI	2019	DETECÇÃO q-PCR	As taxas de recuperação foram maiores que 31,8%, evidenciando a efetividade do método. Entretanto, constatou-se que variações climáticas interferiram na recuperação dos oocistos. Considerando a estação chuvosa como mais propensa a introdução de contaminantes interferentes na detecção.

TABELA 1: Síntese dos principais métodos para detecção de *T.gondii* em amostras de águas

(Continuação)

ROUSSEAU	2019	DETECÇÃO BIOMONITORAMENTO q-PCR	O biomonitoramento foi adaptado a utilização de mexilhões como indicadores da qualidade da água doce e salgada. A técnica desenvolvida demonstrou correlação válida com os bioensaios em camundongos, considerado padrão ouro. Os ensaios de cultura celular, se mostram alternativas promissoras em termos de custo e tempo-resposta. Considerando que, os bioensaios convencionais demandam muito tempo, mão de obra intensiva, preocupações éticas e alto custo.
----------	------	---------------------------------------	---

Fonte: Elaborado pelo autor

4. DISCUSSÃO

A identificação de protozoários patogênicos em amostras de água é realizada através das etapas de concentração, purificação e detecção. Essas etapas foram descritas no método desenvolvido pela Agência Nacional de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, que padronizou uma sequência de técnicas para pesquisa para protozoários como *Cryptosporidium e Giardia*¹⁵. Deste modo, outras experiências foram desenvolvidas utilizando o mesmo arquétipo metodológico na pesquisa de *Toxoplasma gondii*.

A concentração é etapa preliminar que objetiva diminuir a dispersão do micro-organismo alvo por meio de técnicas como a filtração, floculação e centrifugação. Pode ser feita por métodos laboratoriais robustos como o sistema Filta-Max e Envirochek ou alternativamente por membrana filtrante. Porém, esta última demanda menor disponibilidade de recursos financeiros e laboratoriais em relação às demais, além de, apresentar boas taxas de recuperação de oocistos de *Toxoplasma*.

A concentração por membrana filtrante apresentou resultados positivos na pesquisa de *Cryptosporidium e Giardia*, mesmo quando em amostras de composição físico-química complexa¹³. Todavia, o entupimento dos poros da membrana, exigem necessárias trocas com perda de micro-organismos alvo. Ainda estando sua efetividade sujeita à técnica de eluição escolhida¹³. Os detritos contidos na amostra de águas superficiais são importantes limitadores da eficiência da técnica e visualização dos oocistos autofluorescentes¹⁶. As baixas taxas de recuperação sugerem que devem ser feitas modificações que preservem seletivamente os oocistos e aumentem a remoção de outros constituintes da água¹⁶. A filtração de grandes volumes de água tem sido frequentemente utilizada para concentração de amostras. Foi demonstrado através da comparação dos métodos de ultrafiltração e filtração em cápsulas, que associada a utilização da microscopia para detecção de oocistos, se constituem métodos de baixo custo e útil na análise de água potável e ambiental¹⁷. Entretanto, a filtração em cápsulas produziu uma recuperação significativamente maior de oocistos em relação à ultrafiltração¹⁷. Cabe salientar que ao utilizar um sistema de ultrafiltração reutilizável deve-se adotar medidas que evitem a contaminação cruzada das amostras, frequentemente relatada em estudos.

Outro método que pode ser utilizado para concentração de oocistos de *T. gondii* é a floculação, sendo aplicável as amostras com elevada turbidez. Porém, variações nas concentrações dos reagentes ou pH causam diminuição dos organismos floculados¹³. De acordo com resultados descritos, em água desmineralizada e de consumo os oocistos foram

Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA, Três Lagoas, v. 12, n. 1, p.200-216, janeiro/julho. 2021. ISSN: 2447-8822.

recuperados com maior eficiência por floculação com sulfato de alumínio em relação ao sulfato férrico e a centrifugação¹⁸. Todavia, a floculação demonstrou ser menos eficaz para oocistos mais velhos (21 meses), o que pode estar relacionada à modificação estrutural da densidade dos oocistos senescentes¹⁸. Em contrapartida, a centrifugação não foi afetada pelo tipo de água utilizada nos experimentos de recuperação, seja para números altos ou baixos de oocistos. Embora a floculação seja simples e de baixo custo, a filtração é mais confiável no processamento de amostras com alta turbidez, além de diminuir a presença de inibidores pelo uso de filtros¹⁹.

A centrifugação é uma técnica de separação por densidade que pode ser utilizada isoladamente e em associação com outras técnicas. Quando feita com o emprego de formalina a 10% e álcool éter a 100%, obteve-se uma recuperação de 76% a 90% de oocistos em água de consumo²⁰. Foi considerado eficiente e de baixo custo, no entanto, uma desvantagem evidenciada é que o processo requer aliquotagem de volumes de 450ml, portanto, necessárias sucessivas centrifugações e longos períodos de processamento, o que frente a surtos de grande magnitude pode se tornar inaplicável. Porém, neste estudo não foi testado o efeito da turbidez para a determinação da reprodutibilidade. Já na centrifugação contínua, duas amostras podem ser concentradas simultaneamente, diminuindo o tempo gasto no processamento. Apresentou como vantagem a eficiência na concentração, considerando a ausência de filtros o que reduz a perda de patógenos por entupimento²¹.

Após a etapa de concentração de oocistos de *T. gondii* sucede-se a purificação que consiste na segregação do patógeno dos demais elementos e detritos contidos. Entre as técnicas mais utilizadas estão a flutuação em gradiente de sacarose e separação imunomagnética (IMS). A purificação por gradiente de sacarose constitui um método de fácil execução e baixo custo, resultando em taxas de recuperação de 79 a 100% para oocistos esporulados e de 78 a 92% para oocistos não esporulados²². Até o presente momento, não há kits comerciais disponíveis para IMS para oocistos de *T. gondii*. Diante disso, alguns pesquisadores têm buscado validar técnicas que possam auxiliar no desenvolvimento de um anticorpo apropriado. O IMS utilizando o anticorpo monoclonal (4B6) apresentou ligação parede dos esporocistos, sendo considerado específico independentemente do genótipo de *T. gondii*, condições de armazenamento e suspensão dos oocistos²³. Entretanto, houve reação forma cruzada com esporocistos de *Hammondia hammondi*, *H. heydorni* e *Neosporacanium*, em contrapartida não foram ligados a *Cryptosporidium* e *Giardia*²³.

Investigações recentes sobre as propriedades de ligação à superfície dos oocistos, indicaram que estes, podem se ligar à aglutinina lectina do trigo, possibilitando o desenvolvimento de um método de separação dos oocistos das demais partículas²⁴. A separação lecitina-magnética (LMS) em amostra de água, não apresentou vantagem significativa em relação à centrifugação simples quando

em altas concentrações de oocistos²⁵. Todavia, em baixas concentrações o LMS foi mais sensível. A etapa de dissociação de esferas magnéticas pode ocluir os oocistos, prejudicando substancialmente a análise microscópica podendo ser considerada como uma desvantagem desse método²⁵.

A etapa de detecção compreende a identificação do microorganismo que pode ser realizada por microscopia direta ou por técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Conforme descrita na visualização direta por microscopia epifluorescência em membranas processadas, esta demonstrou ser um método quantitativo de baixo custo na detecção de *T. gondii* em amostras ambientais¹⁷. A microscopia de epifluorescência pode ser capaz de detectar oocistos em diversos tipos de amostras de água, obtidos por diferentes métodos de concentração. Entretanto, essa técnica apresenta como principais limitações, a indiferenciação estrutural dos oocistos de *T. gondii* em relação a outros coccídios (*Hammondia*, *Neospora*, *Heydorni*) além da interferência de partículas e artefatos que possam obscurecer a visualização dos oocistos¹⁶.

A PCR em combinação com as técnicas convencionais de concentração e purificação, apresenta grande potencial para detecção de oocistos de *T. gondii*. Todavia, não há muitos ensaios de PCR adaptados para detecção de oocistos em amostras de água. Possivelmente, devido à alta concentração de inibidores presentes em amostras ambientais, como o ácido húmico, ácido fúlvico, carboidratos complexos, metais²⁶. Como também, o baixo número de oocistos de *T. gondii* presentes em grandes volumes de amostra. Assim, foram desenvolvidas alternativas que podem ser utilizadas para remover ou inibir a interferência dessas substâncias (isotiocianato de guanidina, proteinase K e Sephadex). Observou-se que em 39/53 amostras de água que continham inibidores pôde-se detectar DNA após a adição de soro albumina bovina na reação¹⁹. Nesse estudo pôde-se constatar que a PCR foi muito mais sensível que o bioensaio. O bioensaio em camundongos ainda é considerado método de referência para avaliação da infectividade dos oocistos, porém, são necessários em torno de 1 a 5 dias para que a esporulação dos oocistos ocorra antes da inoculação. Além de, aproximadamente quatro semanas, para a obtenção dos resultados sorológicos. Alternativamente, foi desenvolvido um ensaio de PCR quantitativo em tempo real, para diferenciar os oocistos viáveis e não viáveis de *T. gondii*, o método foi adaptado para utilização de mexilhões como indicadores de qualidade da água e demonstrou boa correlação com bioensaios em camundongos²⁷.

A PCR necessita de controle preciso de temperatura, alternando entre aquecimento e resfriamento da solução em três temperaturas específicas. Desta forma, a adaptação da PCR em microchips é relativamente complexa, apresentando algumas limitações relacionadas essencialmente, a utilização em lugares remotos. Sem a necessidade de ciclos de aquecimento, os microssistemas isotérmicos podem ser projetados para serem simples e de baixo consumo de energia, portanto, pode sobrepor a PCR em sistemas de detecção portáteis. A amplificação isotérmica mediada por loop

(LAMP) é uma técnica inovadora que surgiu como uma ferramenta simples e rápida de amplificação de DNA, e pode ser utilizada na identificação de diversos patógenos²⁸. Foram obtidos resultados apontaram a LAMP como altamente específica, fornecendo resultados em 60 minutos após o início da reação²⁹. Estes resultados foram semelhantes para águas residuais³⁰.

Um estudo comparativo entre as técnicas de q-PCR para elemento 529pb e nested-PCR da região ITS1, sugeriram que o q-PCR (529pb) apresenta uma maior sensibilidade³¹, corroborando com outros achados³². Entretanto, esses achados podem estar relacionados às características do elemento de repetição, considerando que o elemento 529pb apresenta mais repetições em relação à região ITS1³³. Alguns trabalhos demonstraram a efetividade de ambos os métodos. O sequenciamento do gene B1 toxoplasma por nested-PCR, foi identificado em 19,4% de amostras de água de uso recreativo³⁴. Foram obtidas taxas de recuperação superiores a 31,8% utilizando q-PCR do gene B1³⁵. A porção 18SrRNA, também pode ser útil na identificação de protozoários patogênicos como *Giardia*, *Acanthamoeba*, *Blastocystis* e *Toxoplasma*, sendo bastante sensível para estudos de diversidade genética³⁶. Semelhantemente a utilização do q-PCR na identificação de múltiplos protozoários, obteve resultados que sugerem o ensaio como ferramenta eficiente e promissora na quantificação simultânea de *G. duodenalis*, *C. parvum* e *T. gondii*³⁷.

Na técnica de amplificação por recombinase polimerase (RPA), a desnaturação do DNA pode ser realizada a uma baixa temperatura constante ao contrário da PCR³⁸. O produto da amplificação pode ser visualizado por uma tira de fluxo lateral contendo uma sonda específica³⁸. A especificidade desta técnica foi avaliada utilizando DNA genômico de 10 isolados de *T. gondii* e outros seis protozoários relacionados, não houve reação cruzada³⁹.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, ao longo dessa revisão, algumas técnicas foram descritas, nota-se, no entanto que todas estão sujeitas a limitações. A filtração foi destacada como método mais robusto e adequado para a concentração de amostras com alta turbidez. Porém além da eficácia, observa-se que o custo-benefício tende a variar de acordo com a escolha dos sistemas de filtração. A ausência de anticorpos comerciais específicos para *T. gondii*, dificulta o desenvolvimento de um método eficaz de separação imunomagnética, as tentativas aqui relatadas demonstraram reação cruzada com antígenos de outros protozoários de ocorrência ambiental. A detecção molecular foi a metodologia mais utilizada nos trabalhos descritos, essencialmente, a amplificação por PCR. Entretanto, para fins de compreensão do risco à saúde pública muitas vezes a simples identificação não é suficiente. Por isso, tem-se discutido a importância da avaliação da infectividade dos oocistos através de bioensaios. O método mais confiável é o ensaio em

camundongos, no entanto, requer tempo-resposta significativamente prolongado e submissões éticas.

Considerando, a ocorrência de surtos de toxoplasmose em diversas regiões geográficas, o Brasil tornou-se protagonista de destaque entre os países da América Latina, desde o primeiro surto ocorrido em 1967 em Bragança-SP. Nesse contexto, a água como elemento chave na cadeia de transmissão, foi demonstrada no maior surto até então registrado no mundo, em Santa Isabel do Ivaí (PR) em 2002. Conforme a ocorrência desses eventos, diversos pesquisadores se debruçaram sobre a temática, objetivando desenvolver métodos de identificação que possam ser amplamente empregados no monitoramento das fontes de transmissão e controle de surtos de veiculação hídrica. A padronização metodológica é uma discussão bastante difundida, visto que, qualificaria a detecção do protozoário frente à ocorrência de eventos de grande magnitude, e até mesmo na prevenção destes. Neste cenário, evidenciamos o absoluto despreparo da rede para atuar e intervir sobre problemas de saúde desta natureza, o que somado aos mais de 35 milhões de indivíduos que não tem acesso ao abastecimento de água tratada, condiciona e determina o adoecimento da população brasileira.

6. REFERÊNCIAS

1. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. The lancet. 2004 Jun;363(9425):1965-1976.
2. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000 Nov;30(12-13):1217-1258.
3. Frenkel K, Dubey P, Miller L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science. 1970 Feb 6;167(3919):893-6.
4. Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 2012 Apr;25(2):264-296.
5. Fromont GE, Lélou M, Dardé LM, Richomme C, Aubert D, Afonso E, et al. InTech. 2012 Sep. [cited 2019 Jun 26]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/toxoplasmosis-recent-advances/the-life-cycle-of-toxoplasma-gondii-in-the-natural-environment>
6. Dumetre A, Dardé L. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in the environmental samples. FEMS Microbiol Rev. 2003 Dec;27(5):651-61.
7. Conrad PA, Miller MA, Kreuder C, James ER, Mazet J, Dabritz H, et al. Transmission of *Toxoplasma*: Clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. Int J Parasitol. 2005 Oct;35(11-12):1155-68.
8. Aubert D, Villena I. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region France. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009 mar; 104(2):290-295.

9. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JR. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*. 2012 Sep;139(11):1375-424.
10. Dias R, Freire R. Surtos de toxoplasmose em seres humanos e animais. *Seminâncias Agrárias*. 2005 Jun;26(2):239-247.
11. Breganó MR, Lopes-Mori RMF, Navarro TI. Toxoplasmose adquirida na gestação congênita. *Eduel*. 2010;62: 978-85-7216-676-8
12. Superintendência de Vigilância em Saúde (Brasil). Relatório da atualização de Investigação de Surto. Santa Maria-RS. Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul; 2018 Set. D07-1548.
13. Franco BMR, Hachich ME, Sato ZIM, Naveira MR, Silva CE, Campos CMM, et al. Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium* ssp. e *Giardia* spp em água destinada ao consumo humano, para atendimento as demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2012 Jun;21(2):233-242.
14. Cordeiro, MA. Revisão sistemática: uma revisão narrativa. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. Rev. Col. Bras. Cir. 2007 dez;34(6):428-431.
15. Environmental Protection Agency (USEPA). Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. 2012 Jun [acesso em 12 ago 2019] Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-1623.pdf>. Acesso em: 14 Jun. 2019.
16. Verant LM, d'Ozouville N, Parker PG, Shapiro K, VanWormer E, Deem SL. 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*. 2014 Jun;11(2):207-214.
17. Shapiro K, Mazet JA, Schriewer A, Wuertz S, Fritz H, Miller WA. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres in water using ultrafiltration and capsule filtration. *Water Res*. 2010 Feb;44(3):893-903.
18. Kourenti C, Heckroth A, Tenter A, Karanis P. Development and Application of Different Methods for the Detection of *Toxoplasma gondii* in Water. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Jan; 69(1): 102–106
19. Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferté H, Inglard CJ, Bisiaux DH, et al. Evaluation of a Strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst Detection in Water. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Jul; 70(7): 4035–4039.

20. Lora-Suarez F, Rivera F, Triviño-Valencia J, Gomez-Marin JE. Detection of protozoa in water samples by formalin/ether concentration method. *Water Res.* 2016 Sep 1;100:377-381.
21. Borchadt AM, Spencer KS, Bertz DP, Ware WM, Dubey PJ, Alan Lindquist DH. Concentrating *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayentanensis* from surface water and drinking water by continuous separation channel centrifugation. *J Appl Microbiol.* 2009 Oct;107(4):1089-97.
22. Kourenti C, Karanis P. Evaluation and applicability of a purification method coupled with nested PCR for the detection of *Toxoplasma* oocysts in water. *Lett Appl Microbiol.* 2006 Nov;43(5):475-481.
23. Dumetre A, Dardé LM. Detection of *Toxoplasma gondii* in water by an immunomagnetic separation method targeting the sporocysts. *Parasitol Res.* 2007 Sep;101(4):989-96.
24. Harito JB, Campebell AT, Prestrud KW, Dubey JP, Robertson LJ. Surface binding properties of aged and fresh (recently excreted) *Toxoplasma gondii* oocysts. *Exp Parasitol.* 2016 Jun;165:88-94.
25. Harito BT, Campebell AT, Tysnes KR, Dubey JP, Robertson LJ. Lectin-magnetic separation (LMS) for isolation of *Toxoplasma gondii* oocysts from concentrated water samples prior to detection by microscopy or qPCR. *Water Res.* 2017 May 1;114:228-236.
26. Schwab JK, McDevitt JJ. Development of a PCR-Enzyme Immunoassay Oligoprobe Detection Method for *Toxoplasma gondii* oocysts, Incorporating PCR Controls. *Development of a PCR-Enzyme Immunoassay Oligoprobe Detection Method for Toxoplasma gondii oocysts, Incorporating PCR Controls.* *Appl Environ Microbiol.* 2003 Oct; 69(10): 5819–5825.
27. Rousseau A, Escotte-Binet S, La Carbona S, Dumètre A, Chagneau S, Favennec L, et al. *Toxoplasma gondii* oocyst infectivity using a sporocyst-based cell-culture assay combined with qPCR for environmental applications. *Appl Environ Microbiol.* 2019 Oct 1;85(20): e01189-19.
28. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):e63.
29. Sotiriadou I, Karanis P. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008 Dec;62(4):357-365.
30. Lindemann G, Sotiriadou I, Mahmodi MR, Karanis P. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in different water resources by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Acta Trop.* 2013 Feb;125(2):231-236.

31. Wells B, Shaw H, Innocent G, Guido S, Hotchkiss E, Parigi M. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in water samples from Scotland and a comparison between the 529bp real-time PCR and ITS1 nested PCR. *Water Res.* 2015 Dec 15;87:175-181.
32. Wenli Yang, H. D. Alan Lindquist, Vitaliano Cama, Frank W. Schaefer, III, Eric Villegas. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in Water Sample Concentrates by Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Jun; 75(11): 3477–3483.
33. Homan LW, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol.* 2000 Jan;30(1):69-75.
34. Adamaska M. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in natural surface water bodies in Poland. *J Water Health.* 2018 aug; 16(4):657-660.
35. Galvani AT, Christ APG, Padula JA, Barbosa MRF, Araujo RS, Sato MIZ, et al. Real-time PCR detection of *Toxoplasma gondii* in surface water samples in São Paulo, Brazil. *Parasitol Res.* 2019 Feb;118(2):631-640
36. Moreno Y, Moreno ML, Amorós I, Pérez R, Morilo JÁ, Alonso JL. Multiple identification of most important waterborne protozoa in surface water used for irrigation purposes by 18S rRNA amplicon-based metagenomics. *Int J Hyg Environ Health.* 2018 Jan;221(1):102-111.
37. Marangi M, Giangasparo A, Lacasella B, Lonigro A, Gasser B. Multiplex PCR for the detection and quantification of key zoonotic genotypes of *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Toxoplasma* in waste water and mussels. *Mol Cell Probes.* 2015 Apr;29(2):122-125.
38. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* 2006 Jul;4(7):e204.
39. WU DY, Xu MJ, Wang QQ, Zhou CX, Wang M, Zhu XQ. Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow (LF) strip for detection of *Toxoplasma gondii* in the environment. *Vet Parasitol.* 2017 Aug 30;243:199-203