

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Ludimila Santos Amaral

Identificação molecular de enteroparasitos em areia de praias do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

Ludimila Santos Amaral

Identificação molecular de enteroparasitos em areia de praias do Rio de Janeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Adriana Sotero Martins
Coorientador: Dr. Antonio Nascimento Duarte

Rio de Janeiro

2016

Título do trabalho em inglês: Molecular identification of enteroparasites in sand of Rio De Janeiro beaches.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – 31010016015P0.

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

A485i Amaral, Ludimila Santos.
 Identificação molecular de Enteroparasitos em areia de praias do
Rio de Janeiro / Ludimila Santos Amaral. -- 2016.
 97 f. : il. color ; graf. ; mapas ; tab.

 Orientadora: Adriana Sotero Martins.
 Coorientador: Antonio Nascimento Duarte.
 Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de
Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2016.

 1. Praias. 2. Qualidade Ambiental. 3. Perfis Sanitários - análise.
4. Areia. 5. Reação em Cadeia da Polimerase. 6. Enteropatias
Parasitárias. 7. Helmintos. 8. DNA de Protozoário. I. Título.

CDD – 23.ed. – 363.7098153

Ludimila Santos Amaral

Identificação molecular de enteroparasitos em areia de praias do Rio de Janeiro

Tese apresentada ao Programa de Pósgraduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 31 de outubro de 2016.

Banca Examinadora

Prof^a Dr^a., Gina Torres Rego Monteiro
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof^a Dr^a., Elvira Carvajal
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof Dr., Jesus Pais Ramos
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof Dr., Jairo Pinheiro da Silva
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof^a Dr^a., Adriana Sotero Martins (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof Dr., Antônio Nascimento Duarte (Coorientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2016

"Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, que me deu forças para vencer todas as dificuldades. Aos meus pais pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis. Sem eles nada seria possível."

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar saúde e sabedoria nesta longa caminhada de aprendizado e vitórias. Por se fazer presente nos momentos de derrota e fraqueza, por nos confiar à vida e por ser o único a conhecer todo o nosso ser, ajudando-nos a superar mágoas e desencantos, fazendo de nós pessoas mais fortes e verdadeiras.

Aos meus pais, Aluizio e Adenete, pelos ensinamentos, carinho, compreensão, por se fazer presente nos momentos mais difíceis, incentivando a sempre prosseguir, me fortalecendo, ensinando que os caminhos devem ser percorridos sem medo, e os obstáculos vencidos. A vocês, o meu amor eterno.

Aos meus irmãos, Leonardo e Luciana, pelo incentivo, carinho e pelos momentos de alegria.

Ao Dr. Antônio Nascimento Duarte, pela ajuda, confiança e incentivo, fornecendo todas as condições necessárias para a realização dos experimentos.

A Dr^a. Elvira Carvajal que me auxiliou no desenvolvimento da metodologia e nas técnicas de laboratório.

Ao meu marido Vinícius Tunholi, pela ajuda, incentivo, dedicação e por seu companheirismo. Muitos dos seus conselhos e dicas jamais serão esquecidos e com certeza fortaleceram minha formação. Pelos momentos de alegrias, por se fazer presente nos momentos difíceis.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Adriana Sotero Martins, pelos ensinamentos concedidos e fundamentais para a conclusão deste estudo. Pela dedicação e orientação.

"Desistir, nunca foi uma opção"
MOURA, 2016.

RESUMO

Para a Organização Mundial da Saúde, ambientes contaminados enquadram-se como importantes meios de transmissão de doenças para humanos e animais, por apresentar condições intrínsecas ideais ao desenvolvimento e manutenção de ciclos parasitários. Nesse contexto, dois agentes assumem importância principal, *Ascaris lumbricoides* e *Giardia intestinalis*, em razão a elevada endemicidade registrada no mundo e pelos aspectos patológicos por vezes registrados no homem. Em ambos os casos, a infecção mostra-se diretamente relacionada a processos de contaminação fecal do ambiente, garantindo a veiculação de estruturas parasitárias que serão adquiridas por hospedeiros susceptíveis. Atualmente, os avanços relacionados aos métodos moleculares fornecem novas oportunidades para o diagnóstico parasitológico em amostras ambientais, permitindo atuar na genotipagem e no melhor entendimento dos aspectos epidemiológicos envolvidos no aparecimento e dispersão desses agentes no meio. O objetivo desse estudo foi padronizar métodos moleculares voltados para a detecção de DNA de parasitos em amostras de areia, contribuindo para o estabelecimento de novos padrões de qualidade sanitária. Um total de 129 amostras de areia foram coletadas de 4 praias da Baía de Guanabara, duas situadas na Ilha do Governador (IG), praia da Bica e da Ponta do Tubiacanga, e as outras duas localizadas na Ilha de Paquetá (IP), José Bonifácio e dos Tamoios. Estas foram previamente processadas pela técnica de Lutz adaptada, permitindo concentrar as amostras estudadas. A extração de DNA foi realizada do sobrenadante da técnica em questão, por meio de dois métodos de extração adaptados: *QIAamp DNA Stool Mini Kit*[®]- *Qiagen* e *GeneClean Kit*. Os produtos da PCR originaram bandas amplificadas de 264 pb para *A. lumbricoides* e 753 pb para *G. intestinalis*. Do total das amostras estudadas 56,6% (73/129) foram consideradas positivas para *A. lumbricoides* e 82,2% (23/28) positivas para *G. intestinalis*. Esses dados confirmam que as técnicas de biologia molecular desenvolvidas podem ser utilizadas para identificar a presença de parasitos em amostras ambientais. E tais achados confirmaram molecularmente a contaminação fecal das amostras estudadas e ressaltam a presença de estruturas infectantes que colocam em risco a saúde humana. Estes dados alertam as autoridades sobre os cuidados envolvidos no tratamento e monitoramento dessas matrizes, ressaltando a necessidade de implementar novas medidas focadas na prevenção e controle da acariase e giardíase.

Palavras-chaves: Praias; Qualidade sanitária; Areia; PCR; Helminhos e Protozoários.

ABSTRAT

According to the World Health Organization, contaminated environments are among the most important causes of the transmission of diseases to humans and animals, due to intrinsic conditions ideal for development and maintenance of parasite life cycles. In this context, two agents stand out, *Ascaris lumbricoides* and *Giardia intestinalis*, because of the high endemicity recorded in the world and the pathological aspects related to humans. In both cases, infection is directly related to contamination by fecal matter, promoting the spread of these parasites to susceptible hosts. Recent advances in molecular methods provide new opportunities for parasite diagnosis in environmental samples, permitting genotyping and better understanding of the epidemiological aspects involved in the appearance and dispersion of these agents in the environment. The objective of this study was to standardize molecular methods to detect DNA of parasites in beach sand samples, to help establish new sanitary quality standards. A total of 129 sand samples were collected at four beaches in Guanabara Bay (Rio de Janeiro), two located on Ilha do Governador (IG), Bica and Ponta do Tubiacanga beaches, and the two others located on Ilha de Paquetá (IP), José Bonifácio and Tamoios beaches. The samples were first processed according to the technique of Lutz, with adaptation, for concentration. The DNA was extracted from the supernatant from that technique with two commercial kits, with some modifications of the manufacturers' recommendations: QIAamp DNA Stool Mini Kit[®] (Qiagen) and GeneClean Kit (MP Biomedicals). The PCR products originated amplified bands of 264 pb for *A. lumbricoides* and 753 pb for *G. intestinalis*. Of all the samples analyzed, 56.6% (73/129) were considered positive for *A. lumbricoides* and 82.2% (23/28) positive for *G. intestinalis*. These data confirm that the molecular biology techniques developed can be used to identify the presence of parasites in environmental samples. The findings also molecularly confirm the fecal contamination of the samples studied and emphasize the presence of infective structures that pose a risk to human health. Finally, these data serve as an alert to public authorities of the need for better monitoring and treatment of this contamination, in particular measures for prevention and control of acariasis and giardiasis.

Keywords: Beaches; Sanitary quality; Sand; PCR; Helminths; Protozoa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1.	Comparação entre os resultados obtidos com a técnica de Ritchies modificada, Sheather modificada e ELISA para a detecção do protozoário <i>Giardia lamblia</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Cryptosporidium</i> sp. em amostras de água.....	20
Figura 1.	Ciclo pobreza versus saúde.....	22
Figura 2.	Índices das doenças mais prevalentes evidenciando o impacto econômico, mortalidade anual estimada por doença e prevalência global estimada.....	25
Figura 3.	Principais doenças negligenciadas classificadas pela organização mundial da saúde.....	26
Figura 4.	Prevalência das principais geo-helminthiases (<i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Trichuris trichiura</i> e <i>Ancilostoma duodenales</i>) na América Latina, baseado em pesquisa bibliográfica para região.....	29
Figura 5.	Microscopia de luz realizada em matrizes ambientais (areias) naturalmente contaminadas por ovos férteis de <i>Ascaris lumbricoides</i>	37
Figura 6.	Ciclo biológico ilustrativo da espécie <i>Ascaris lumbricoides</i>	39
Figura 7.	Ciclo biológico ilustrativo de <i>Giardia duodenales</i>	42
Figura 8.	Mapa Geográfico da Baía de Guanabara - RJ, com destaque para as áreas de coleta das amostras de areia de praia, na Ilha do Governador: TU - Praia do Tubiacanga; BI – Praia da Bica; na Ilha de Paquetá: JB – Praia José Bonifácio; TA – Praia de Tamoios.....	46
Quadro 2.	Períodos das Coletas de Amostras nas Praias da Bica (BI), Tubiacanga (TU), José Bonifácio (JB) e Tamoios (TA).....	48
Quadro 3.	Números das amostras que participaram do método de extração 1.....	51
Quadro 4.	Sequencia esperada do amplicon para <i>Ascaris</i> sp. e tamanho esperado.....	53
Quadro 5.	Sequencia esperada do amplicon para <i>Giardia</i> sp. e tamanho esperado....	53

Quadro 6.	Condições de termociclagem da PCR utilizando os oligonucleotídeos para ambos os parasitos.....	55
Figura 9.	Quadro demonstrativo da busca de similaridade no banco de dados do GenBank, no BLASTn, para a sequência de 24 nucleotídeos do iniciador de <i>Ascaris sp.</i> , AS-F1, realizada em julho/2016.....	57
Figura 10.	Sequências produzindo alinhamentos significativos no BLASTn para o iniciador de <i>Ascaris sp.</i> (AS-F1).....	58
Quadro 7.	A identidade com sequência do iniciador do (AS-F1) encontrado no BLASTn.....	58
Quadro 8.	A identidade com sequência do iniciador do (AS-R1) encontrado no BLASTn.....	59
Figura 11.	Quadro demonstrativo da busca de similaridade no banco de dados do GenBank, no BLASTn, para a sequência de 26 nucleotídeos do iniciador de <i>Giardia sp.</i> (G7F), realizada em julho/2016.....	60
Figura 12.	Sequências produzindo alinhamentos significativos no BLASTn para o iniciador de <i>Giardia sp.</i> (G7F).....	60
Quadro 9.	A identidade com sequência do iniciador do (G7F) encontrado no BLAST.....	61
Figura 13.	Comparação das amostras extraídas por ambos os métodos (1 e 2) para <i>Ascaris sp.</i>	63
Figura 14.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 7; 38; 94; 117; 114. Sendo: PM – Marcador de Peso Molecular; CP - controle positivo para o alvo.....	64
Figura 15.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 10; 17; 18; 24; 39; 41; 43; 52.....	65
Figura 16.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 54; 59; 57; 58; 61; 60; 86; 6, 13.....	65
Figura 17.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 12; 11; 15; 51; 1; 2; 27; 26, 45.....	66

Figura 18.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 53; 131;121;132; 128, 125; 127; 122; 123.....	66
Figura 19.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 138; 140; 137; 134; 133; 136.....	67
Figura 20.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 103; 95; 113; 69; 67; 74; 101.....	67
Figura 21.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 8; 9; 32; 48.....	68
Figura 22.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 88; 7; 111.....	68
Figura 23.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 33 e 30.....	69
Figura 24.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base na amostra: 89.....	69
Figura 25.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base na amostra 92.....	70
Figura 26.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Não foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras.....	70
Figura 27.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo <i>Ascaris sp.</i> Não foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras.....	71
Figura 28.	Percentagem de amostras positivas diagnósticas em matrizes ambientais (areia) nos diferentes métodos testados para <i>Ascaris sp.</i>	71

Figura 29.	Perfil das amostras ambientais avaliadas pelos diferentes métodos de diagnóstico testados. <i>Ascaris sp.</i>	72
Figura 30.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise de reamplificação da banda para <i>Ascaris sp.</i> . Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 57, 47; 124; 131.....	73
Figura 31.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise de reamplificação da banda para <i>Ascaris sp.</i> . Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 126; 128; 139; 135; 102 e 104.....	73
Figura 32.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise de reamplificação da banda para <i>Ascaris sp.</i> . Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 70; 116; 68.....	74
Figura 33.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo <i>Giardia sp.</i> . Foi observado o amplicon esperado de 753 pares de base nas amostras: Gia 2; Gia Cult; Gia 5; 2;17; 18; 132; 134; 103;104.....	75
Figura 34.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo <i>Giardia sp.</i> . Foi observado o amplicon esperado de 753 pares de base nas amostras: 95; 62; 86; 94; 117; 118; 55; 43; 46; 41.....	75
Figura 35.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo <i>Giardia sp.</i> . Foi observado o amplicon esperado de 753 pares de base nas amostras: 7; 16; 42; 49.....	76
Figura 36.	Porcentagem de amostras positivas diagnósticas em matrizes ambientais (areia) nos diferentes métodos testados para <i>Giardia sp.</i>	76
Figura 37.	Perfil das amostras ambientais avaliadas pelos diferentes métodos de diagnóstico testados. <i>Giardia sp.</i>	77
Figura 38.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise de reamplificação da banda para <i>Ascaris sp.</i> . Foi observado o amplicon esperado de 753 pares de base nas amostras: 60 e 63.....	78
Figura 39.	Porcentual de Identificação de <i>Ascaris sp.</i> por Biologia Molecular nas 4 praias.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Proporção das principais causas de morte, por Grandes Regiões, segundo as principais causas de morte - 2000/2005.....	24
Tabela 2.	Valores numéricos dos biomarcadores de saúde ambiental.....	32
Tabela 3.	Classificação para Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> segundo modificação a partir da Resolução N° 468/2010, da Secretaria Municipal de Meio Ambiente da Cidade do Rio de Janeiro, dados expressos em UFC/g.....	36
Tabela 4.	Coordenadas dos pontos amostrais.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ALERJ	Assembleia Legislativa do Estado do Rio de Janeiro
BI	Bica
CONAMA	Conselho Nacional do meio Ambiente
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfato
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IG	Ilha do Governador
JB	José Bonifácio
Larva Fila	Larva Filarióide
Larva Rab	Larva Rabdtóide
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
Na Cl	Cloreto de sódio
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PQT	Paquetá
RNA	Ácido Ribonucleico
TA	Tamoios
TU	Tubiacanga
$\text{U}/\mu\text{L}$	Unidade por microlitro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
V	Volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	DESIGUALDADE SOCIAL, SAÚDE E MEIO AMBIENTE.....	22
2.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS GEO-HELMINTOS: PANORAMA ATUAL NA AMÉRICA LATINA E BRASIL.....	27
2.3	PARASITOS COMO INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL PROPOSTOS NA LITERATURA.....	30
2.4	LEGISLAÇÕES BRASILEIRAS SOBRE A QUALIDADE DA AREIA.....	34
2.4.1	No município do Rio de Janeiro	35
2.4.2	Padrões Internacionais	36
2.5	NEMATÓIDES.....	36
2.5.1	<i>Ascaris lumbricoides</i>	36
2.5.2	Ciclo biológico	37
2.5.3	Mecanismos de transmissão de <i>Ascaris</i> sp	39
2.5.4	Aspectos epidemiológicos	40
2.6	PROTOZOÁRIOS.....	41
2.6.1	<i>Giardia intestinalis</i>	41
2.6.2	O agente e seu ciclo biológico	41
2.6.3	Mecanismos de transmissão de <i>Giardia</i> sp	42
2.6.4	Aspectos epidemiológicos da <i>Giardia</i> sp	43
3	JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	44
4	OBJETIVOS	45
4.1	OBJETIVO GERAL.....	45
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
5	METODOLOGIA	46
5.1	ÁREA DE ESTUDO.....	46
5.2	COLETA DAS AMOSTRAS NOS PERÍODOS DE MONITORAMENTO.....	47
5.3	PROCESSAMENTO PARA ANÁLISES POR MEIOS TRADICIONAIS.....	49
5.3.1	Técnica de Lutz Adaptada (Sedimentação Espontânea)	49
5.4	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA POR BIOLOGIA CELULAR.....	49
5.4.1	Protocolo QIAamp DNA Stool MiniKit (Método 1)	50

5.4.2	Protocolo GeneClean Kit adaptado (Método 2)	51
5.5	CLASSIFICAÇÕES DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS.....	51
5.6	AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	52
5.6.1	Para amplificação de porção de gene mitocondrial de <i>Ascaris sp.</i>	52
5.6.2	Para amplificação do Gene de beta-giardin de <i>Giardia sp.</i>	53
5.6.3	Especificidade dos oligonucleotídeos	54
5.7	CONDIÇÕES DA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR).....	54
5.7.1	Concentração dos Reagentes na PCR	54
5.7.2	Ciclagem do Termociclador para PCR	55
5.7.2.1	Ciclagem para o alvo de <i>Ascaris</i> e <i>Giardia sp.</i>	55
5.7.3	Eletroforese de DNA em Gel de Agarose	56
5.8	REAMPLIFICAÇÃO DE BANDA.....	56
6	RESULTADOS	57
6.1	SEQUENCIAIS POSSÍVEIS DE AMPLIFICAÇÃO A PARTIR DE AMOSTRAS AMBIENTAIS.....	57
6.1.1	Com iniciadores desenhados para identificação de <i>Ascaris sp.</i>	57
6.1.2	Com iniciadores desenhados para identificação de <i>Giardia sp.</i>	60
6.2	REPRESENTATIVIDADE DOS RESULTADOS PARASITOLÓGICOS DAS AMOSTRAS POR MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO POR MICROSCOPIA E ELISA.....	61
6.3	ANÁLISE POR BIOLOGIA MOLECULAR COM INICIADORES PARA <i>Ascaris sp.</i>	62
6.3.1	Diferenciado pelo método de extração de DNA	62
6.3.2	Direto Sem diferenciar o Método de Extração de DNA	63
6.4	COM REAMPLIFICAÇÃO PARA O ALVO <i>Ascaris sp.</i>	72
6.5	ANÁLISE POR BIOLOGIA MOLECULAR COM INICIADORES PARA <i>Giardia sp.</i>	74
6.5.1	Direto Sem diferenciar o Método de Extração de DNA	74
6.5.2	Com Reamplificação para o alvo <i>Giardia sp.</i>	77
6.6	CONDIÇÕES SANITÁRIAS DA AREIA DAS PRAIAS DA BAÍA DE GUANABARA POR MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	78
6.6.1	Com os iniciadores para <i>Ascaris sp.</i>	78
7	DISCUSSÃO	80

8	CONCLUSÕES.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	APÊNDICE I.....	94
	APÊNDICE II.....	97

1 INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais estão amplamente distribuídas no mundo, constituindo-se em um grave problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (OMS, 2009). A gravidade da doença está relacionada a carga infectante e ao número de organismos adquiridos ao longo do tempo de recrutamento, sendo as exposições frequentes responsáveis, em muitos casos, pelo aumento da carga parasitária (CÔRTEZ, 2010).

Esta questão de saúde pública não é uma preocupação exclusiva dos países em desenvolvimento com infraestrutura sanitária deficitária, uma vez que, as nações desenvolvidas também enfrentam problemas relacionados à ocorrência de surtos epidêmicos de doenças, especialmente aquelas transmitidas pela água, apesar de possuírem elevado padrão de abastecimento urbano e tratamento de esgoto, resultando no homem aspectos clínicos e patológicos diversos, das quais a gastroenterite mostra-se mais frequente (CRAUN et al., 1998).

Neste contexto, a exposição às matrizes ambientais, como água e areia contaminados por bioindicadores fecais, pode ser responsável pela transmissão de inúmeros patógenos, especialmente quando frequentado por animais e pessoas (AMARAL, 2012; SOTERO-MARTINS et al. 2014). De acordo com Gale e Stanfield (2000), entre os diferentes organismos envolvidos na cadeia de transmissão de doenças, os protozoários configuram os agentes mais preocupantes, sobretudo de infecções de veiculação hídrica, uma vez que, mostram-se amplamente resistentes às condições ambientais adversas, sendo, portanto, capazes de causar infecções mesmo em concentrações relativamente baixas. Entre os diferentes gêneros, dois se destacam, pela elevada frequência em que são notificados nos estudos epidemiológicos: *Cryptosporidium sp* e *Giardia sp*. De acordo com levantamentos realizados, nos últimos 28 anos, ocorreram 524 casos em todo mundo, com maior prevalência demonstrada em países em desenvolvimento (KARANIS et al., 2004). Em 2011, autores fornecem dados atualizados sobre a ocorrência de surtos epidemiológicos por protozooses veiculadas pela água, ressaltando a ocorrência de 325 quadros de infecção causadas por *Giardia sp*. e 199 por *Cryptosporidium sp*. Tais infecções evoluem, em alguns casos, para quadros sintomatológicos, no qual a gastroenterite é a doença mais comum, que, associada à água poluída, pode apresentar um ou mais dos seguintes sintomas: enjojo, vômitos, dores de estômago, diarreia, cefaleia e febre, podendo ocorrer outras manifestações, como infecções dos olhos, ouvidos, nariz e garganta (BONILLA et al., 2007).

De acordo com Sotero-Martins et al. (2014), o processo de contaminação ambiental por formas infectantes de protozoários e helmintos depende de vários fatores, entre os quais o número de formas infectantes excretadas, hábito do hospedeiro, distribuição geográfica, saneamento, qualidade da água, clima, concentração e localização de hospedeiros infectados, são elementos determinantes nesta esfera.

Tal condição é importante, uma vez que atualmente, um aumento crescente de animais domiciliados e peridomiciliados ganham acesso a áreas de lazer como praia e praças públicas, aumentando consideravelmente o risco de infecção ao homem. Isso decorre em função ao padrão de desenvolvimento biológico apresentado por estes agentes, que apresentam parte do seu ciclo no ambiente, resultando a partir de condições ambientais favoráveis, a formação de estruturas infectantes e, portanto, aptas a iniciar um novo ciclo parasitário. Assim, ainda que animais domésticos, como cães e gatos, atuem como hospedeiros naturais de parasitos próprios, capazes de evoluir para a latência exclusivamente nestes organismos, parte assume grande importância em saúde pública, uma vez que humanos podem acidentalmente se infectar resultando em inúmeros agravos a sua saúde.

Portanto, pela importância aquilatada a estas áreas, pesquisas têm sido conduzidas no Brasil e no mundo com o intuito de diagnosticar a contaminação do solo por helmintos e protozoários com potencial zoonótico. Dentre os vários helmintos encontrados destacam-se *Ancylostoma braziliense*, *Toxocara canis* e *Trichuris spp* por serem os mais frequentes, encontrados tanto diretamente nas fezes dos cães, como também em areias ou terras examinadas (MORO et al., 2008; SILVA et al., 2009).

Em relação aos gêneros de protozoários mais comumente envolvidos em quadros de infecções transmitidas por matrizes ambientais contaminadas, *Cryptosporidium spp*, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica* se destacam, não somente pela elevada frequência em que são determinadas, mas principalmente por resultarem em doenças gastrointestinais consideradas um grave problema para a saúde pública. Tais elementos podem estar presentes em águas superficiais, também em água potável e tratada, na forma de oocisto (*Cryptosporidium spp*) e cisto (*Giardia intestinalis* e *Entamoeba histolytica*), indicando contaminação fecal (MONS, 2009). Esses são transmitidos por via orofecal, sendo considerados importantes agentes de doenças diarreicas de veiculação hídrica, em humanos e animais em todo o mundo (REYNOLDS et al. 2008).

Entre as abordagens mais recentes sobre o controle da qualidade microbiológica e parasitológica em áreas de recreação, ressaltasse o trabalho apresentado em 2014 por Sotero-Martins et al.. Neste estudo, além de mencionarem dados atualizados sobre a legislação

vigente voltada para o monitoramento de microrganismos encontrados em matrizes ambientais, os autores abordam tópicos críticos da área de saneamento ambiental, determinação de bioindicadores e riscos associados à saúde, além das principais doenças causadas pela exposição a matrizes ambientais contaminadas.

Outro estudo importante que vem contribuir diretamente para esta temática foi feito por Amaral et al. (2015). Neste, os autores destacam a importância das helmintíases intestinais em saúde pública, que estão entre os patógenos mais frequentes encontrados em humanos, além das possíveis complicações que esta associação possa resultar no hospedeiro. Outro aspecto importante mencionado no trabalho são os fatores de risco associado à transmissão desses patógenos. Segundo os autores, a contaminação de espaços públicos como areia de praia, parques públicos e *playground* por excretas de cães e gatos, contribuem para o aumento dessa casuística, uma vez que, muitos desses organismos apresentam etapa de desenvolvimento no meio, resultando na formação de estruturas infectantes que poderão ser assimilados por diferentes hospedeiros, incluindo o homem. Assim, a padronização de métodos de diagnóstico em matrizes ambientais assume papel determinante, por possibilitar o monitoramento desses ambientes e desta forma, minimizar a transmissão de patógenos.

O diagnóstico de certeza de um processo parasitológico é dado pela demonstração da presença do parasito ou de seus produtos no organismo do hospedeiro. Entretanto, nem sempre é possível ou fácil de comprovar a existência do parasitismo (REY, 2008).

Segundo Rey (2008), os métodos imunológicos diretos e indiretos têm sido muito empregados, para detectar antígenos, anticorpos ou imunocomplexos relacionados com a existência da infecção parasitária em amostras biológicas. Esses métodos se caracterizam pela simplicidade e rapidez de execução, possibilidade de automação e baixo custo operacional. Podem ser aplicados em pacientes para o diagnóstico diferencial entre as doenças com quadros clínicos semelhantes que possam estar sendo causa do processo patológico, bem como nos inquéritos epidemiológicos. Além da eficácia clínica comprovada, métodos imunoenzimáticos têm sido também empregados no diagnóstico parasitológico de matrizes ambientais, auxiliando no monitoramento desses meios. Tal possibilidade foi demonstrada por Da Silva et al., (2012) ao investigar a eficácia e sensibilidade da técnica de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) na detecção de estruturas parasitárias, cistos e oocistos, em água e solo. Os resultados apresentados indicam que o método ELISA é mais sensível no diagnóstico parasitológico quando comparado às técnicas coproparasitológicas tradicionais, revelando maior número de amostras positivas. Esta maior sensibilidade apresentada pelo ELISA decorre da sua capacidade em capturar superfícies antigênicas, independentemente da

integridade apresentada pelos cistos e oocistos. Por outro lado, na microscopia, a integridade dos cistos e oocistos é essencial no sucesso do diagnóstico.

Quadro 1. Comparação entre os resultados obtidos com a técnica de Ritchies modificada, Sheather modificada e ELISA para a detecção do protozoário *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium sp.* em amostras de água.

Protozoa	ELISA		Ritchie's mod. technique		Sheather's mod. technique		MN	
	No.+	No.-	No.+	No.-	No.+	No.-	ExR	ExS
Cyst of <i>Entamoeba histolytica</i>	6	42	2	46	2	46	0.08	0.08
Oocyst of <i>Cryptosporidium sp.</i>	10	38	0	48	0	48	NF	NF
Cyst of <i>Giardia lamblia</i>	9	39	4	44	4	44	0.06	0.06

Legenda: No +: Número de amostras positivas; No -: Número de amostras negativas; E: ELISA; R: Técnica modificada de Ritchie; S: Técnica modificada de Sheather. Fonte: Da Silva et al., (2012).

A pesquisa de anticorpos em uma população, ou em amostras representativas, tem sido utilizada com frequência para determinar a prevalência de uma parasitose. No entanto, os testes imunológicos devem ser devidamente interpretados para se evitarem falhas e falsos resultados que podem decorrer da variação antigênica do patógeno ou da resposta imune do hospedeiro (REY, 2008).

Com o surgimento das ferramentas de diagnóstico molecular veio também o interesse em se aplicar estas técnicas ao estudo dos parasitos intestinais. As técnicas moleculares passaram então a ser aplicadas principalmente no sentido de distinguir espécies crípticas e/ou muito intimamente relacionadas. Estudos filogenéticos têm sido usados para averiguar a origem, dispersão e relações entre determinados grupos de parasitos. No entanto, no universo dos parasitos intestinais, ainda é pequeno o número de genes e de genomas completos de helmintos disponíveis (LELES, 2010). O estudo de genomas pode proporcionar um conhecimento profundo de parasitos patogênicos, assim como dos mecanismos de resistência do parasito e/ou de interação com o hospedeiro que facilitem o parasitismo, e assim contribuir para o desenvolvimento de medicamentos e/ou outras ações que sejam mais eficazes no combate a estes helmintos. Hoje as abordagens de “transcriptoma” e “proteômica” são essenciais ao entendimento destes mecanismos (LELES, 2010).

Tal método, que se baseia na detecção de sequências específicas e conhecidas de DNA ou RNA de parasitos. O uso da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) fundamenta-se na replicação *in vitro* da dupla hélice da molécula de DNA, usada para amplificar o DNA situado entre regiões de uma sequência conhecida. Oligonucleotídeos são usados como nas séries de reações catalisadas por uma enzima, chamada DNA polimerase. A PCR é a síntese de milhões de cópias de um segmento específico de DNA (GONÇALVES, 2002).

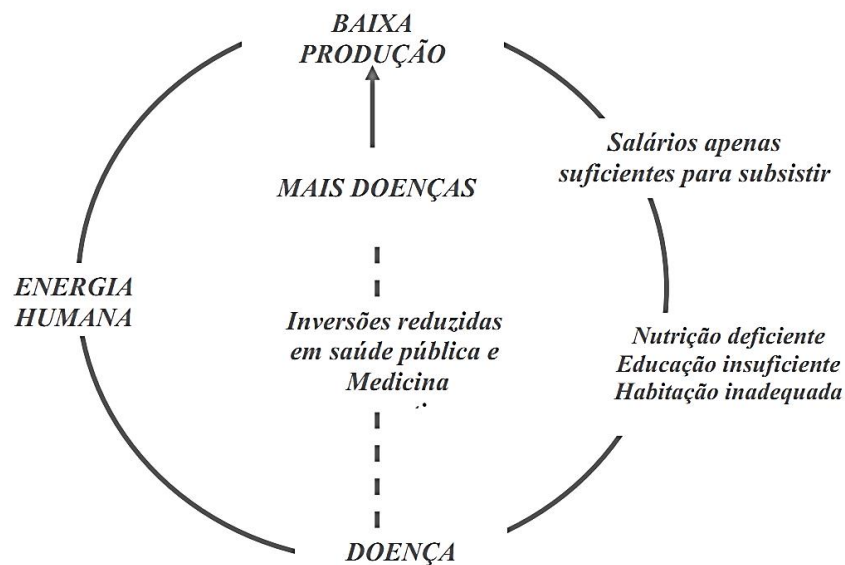
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESIGUALDADE SOCIAL, SAÚDE E MEIO AMBIENTE

A epidemiologia das geohelminthos está diretamente relacionada com os fatores humanos (socioeconômicos e culturais), ambientais (temperatura, umidade, tipo de solo) e ligados à biologia do parasito. Os fatores ambientais são dependentes dos fatores humanos, ou seja, só há prevalência importante de doença onde as ações de saneamento básico são precárias (FORTES et al, 2004).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2001), a influência da pobreza nas condições de saúde de uma população está relacionada de uma forma cíclica; isto é, a baixa produção está vinculada com baixos salários que levam a uma alimentação deficiente, educação insuficiente e qualidade de vida precária. Este processo gera doenças tais como: doenças infecciosas causadas por parasitas, bactérias e vírus; desnutrição e anemias, que são de uma maneira geral pouco assistidas pelas autoridades competentes e a medicina preventiva. Tais fatores fazem com que o quadro de doenças perdure e a energia humana para o desempenho no trabalho seja insuficiente. Desta maneira, o ciclo pobreza *versus* saúde encerra-se e se mantém, como representado na Figura 1, segundo Neves (2003).

Figura 1: Ciclo pobreza *versus* saúde. Fonte: Neves (2003).



Nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil, as mortes relacionadas às doenças infecciosas e parasitárias, embora em processo de declínio ao longo dos anos recentes, ainda são uma componente importante na mortalidade infantil, representando, em 2005, cerca de 10% do

conjunto de óbitos dessa faixa etária (IBGE, 2009).

De acordo com o levantamento realizado pela OMS, alguns fatores aumentam consideravelmente o risco de transmissão de doenças infecciosas e parasitárias, destacando sobretudo, o contato próximo entre humanos, animais e insetos vetores, o crescimento populacional desordenado, a alta densidade urbana, a marginalização de grupos populacionais, migrações, práticas predatórias de uso da terra para agricultura e outras ações humanas prejudiciais ao meio ambiente, catástrofes ambientais, além das mudanças climáticas (OMS, 2012; SHUMAN, 2010). Eles afetam desproporcionalmente pessoas pobres e marginalizadas, porque devido à privação de proteção social, moradia e alimentação, apresentam baixos níveis gerais de saúde, estando mais expostas a doenças.

Outro fator importante que contribui decisivamente para o aparecimento de doenças é a ausência de saneamento básico. Segundo a (OMS, 2012) o saneamento é o controle de todos os fatores do meio físico do homem, que exercem ou podem exercer efeitos nocivos sobre o bem-estar físico, mental e social. De outra forma, pode-se dizer que saneamento caracteriza o conjunto de ações socioeconômicas que tem por objetivo alcançar salubridade ambiental. Assim, entre os diferentes impactos associados intrinsecamente à ausência desse serviço, destaca-se a diarreia que, com mais de quatro bilhões de casos por ano, é uma das doenças que mais aflige a humanidade, pois causa 30% das mortes de crianças com menos de um ano de idade (CVJETANOVIC, 1986).

Ainda que, grande parte dos quadros diarreicos esteja associada a infecções bacterianas, uma parcela, aproximadamente 30%, decorre de infecções parasitárias (IBGE, 2009). Como principais representantes nesta esfera destacam-se: *Ascaris lumbricoides*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba sp* e *Cryptosporidium sp*. Em todos os casos, condições sanitárias precárias, aspectos sociais e culturais e fatores comportamentais contribuem significativamente para a dispersão de estruturas parasitárias no meio, aumentando o índice de doenças intestinais.

Em relação à ocorrência, estudos demonstram que essas acometem principalmente as crianças e os adultos jovens, exercendo importante influência sobre o estado nutricional e crescimento dos mesmos, sendo que o grande prejuízo se traduz no baixo índice de aproveitamento escolar (ASSIS et al., 2003).

É de extrema importância o fato de que essas regiões apresentam problemas relacionados à cobertura dos óbitos em geral, e infantis em particular, com proporções relativamente elevadas de sub-registro. Isto pode estar provocando uma subestimação no nível dessas proporções, visto que se deixa de contabilizar no sistema de estatísticas de óbitos os eventos relacionados a grupos sociais mais carentes da sociedade, e, portanto, mais expostos

ao contágio de ambientes inadequados, no que diz respeito ao saneamento básico, que, como é do conhecimento geral, tem fortes relações com doenças infecciosas e parasitárias (IBGE, 2009).

Tabela 1. Proporção das principais causas de morte, por Grandes Regiões, segundo as principais causas de morte - 2000/2005. Fonte: Ministério da Saúde, Sistema de Informações sobre Mortalidade 2000/2005.

Principais causas de morte	Proporção da mortalidade (%)					
	Brasil	Grandes Regiões				
		Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro-Oeste
2000						
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Doenças infecciosas e parasitárias	4,7	6,1	4,9	4,6	3,8	6,1
Neoplasias (tumores)	12,8	9,0	8,2	14,0	17,1	12,4
Doenças aparelho circulatório	27,6	18,2	21,4	30,0	32,8	27,7
Doenças aparelho respiratório	9,3	7,5	6,9	10,3	11,1	8,3
Afecções período perinatal	3,9	6,0	5,1	3,1	2,7	4,4
Malformações congênitas	1,1	1,5	0,9	0,9	1,1	1,7
Mal definidas	14,3	24,0	28,4	9,7	6,3	8,4
Causas externas	12,2	13,6	11,4	12,6	10,9	16,9
Outras causas	14,2	14,1	12,7	14,8	14,2	14,1
2005						
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Doenças infecciosas e parasitárias	4,6	6,3	4,8	4,6	3,8	5,1
Neoplasias (tumores)	14,7	10,7	11,1	15,7	18,9	13,9
Doenças aparelho circulatório	28,3	20,1	25,8	29,8	30,4	28,8
Doenças aparelho respiratório	9,7	8,8	7,6	10,5	10,8	9,7
Afecções período perinatal	3,0	6,1	4,3	2,2	2,0	3,4
Malformações congênitas	1,0	1,6	1,1	0,8	0,9	1,4
Mal definidas	10,3	17,8	17,2	8,0	5,8	5,2
Causas externas	12,5	15,8	12,4	11,9	12,0	16,8
Outras causas	15,9	12,9	15,8	16,5	15,5	15,7

Ainda relacionadas à infância, tem-se as doenças infecciosas e parasitárias que, de acordo com os resultados encontrados, exibem reduções importantes durante o intervalo de tempo observado. Seu impacto para a redução da esperança de vida oscilou em torno de 0,79 por ano, em 2005, contra 1,24 por ano, em 1996. É causa de morte fortemente associada ao saneamento básico (água e esgoto), a cujo acesso continuam excluídos contingentes importantes da população (IBGE, 2009).

Segundo dados do IBGE, 2009, apenas 28,5% dos municípios brasileiros com esgotamento por rede geral faziam tratamento de esgoto (pelo menos um distrito do município

tratava o esgoto coletado, mesmo que parte dele). Entre as regiões, o Sudeste liderava (48,4%), seguido do Centro-Oeste (25,3%), Sul (24,1%), Nordeste (19%) e Norte (7,6%). Com exceção do Distrito Federal, em apenas três unidades da federação mais da metade dos municípios tratavam seu esgoto: São Paulo (78,4%), Espírito Santo (69,2%) e Rio de Janeiro (58,7%). Os menores percentuais foram registrados em Sergipe (9,3%); Amazonas (4,8%); Pará (4,2%); Rondônia (3,8%); Piauí (2,2%) e Maranhão (1,4%).

Dados apresentados por Hotez et al. (2009) indicam que entre as doenças negligenciadas, aquelas causadas por geo-helminthos é que apresenta maior prevalência, correspondendo mais de 2 bilhões de infectados, sendo todas as outras infecções responsáveis por acometer cerca de meio bilhão de infectados (Figura 2).

Figura 2. Índices das doenças mais prevalentes evidenciando o impacto econômico, mortalidade anual estimada por doença e prevalência global estimada. Fonte: Hotez et al. (2009).

Ano: 2009	Disability Adjusted Life Years - DALYs (Milhões)	Mortes	Prevalência global aproximada (Milhões)
Doenças mais prevalentes			
Ancilostomíase/Necatoriose	1.8-22.1	3000-65000	600
Ascariíase	1.2-10.5	3000-60000	800
Tricuríase	1.6-6.4	3000-10000	600
Filariose linfática	5.8	<500	120
Esquistossomose	1.7-4.5	15000-280000	200
Tracoma	2.3	<500	84
Oncocercose	0.5	<500	37
Lepra	0.2	132000	0.2
Doenças por vírus (Dengue) e protozoários			
Dengue	0.7	19000	50
Leishmaniose	2.1	51000	12
Doença de Chagas	0.7	14000	8-9
Tripanossomíase Africana	1.5	48000	<0.1

Os parasitos são encontrados, de forma persistente, onde se reúnam condições favoráveis para que feche o seu ciclo biológico e sua transmissão. Pela falta de saneamento básico em peridomicílios, o chão mantém-se rico em ovos (MELLO et al., 2004). Entre os helmintos parasitas destacam-se, pela elevada prevalência e ampla distribuição, aqueles que dependem do solo para sua transmissão, por isso denominado geo-helminthos. A importância destes depende, fundamentalmente, da presença de indivíduos infectados, da contaminação fecal do solo, das condições favoráveis ao desenvolvimento dos estágios infectantes, ovos e larvas, e do contato entre indivíduos sãos e o solo contaminado (SILVA et al., 1991).

Dentro do contexto de “doenças” associado à estrutura sanitária da população, particular atenção tem sido direcionada às doenças negligenciadas. De acordo com a definição proposta pela OMS, doenças negligenciadas são aquelas que se disseminam e se perpetuam em meios em que há precária estrutura sanitária, condição de moradia e alimentação, além da dificuldade em se acessar o sistema de saúde pelas pessoas. São doenças que por sua irrelevância enquanto nicho econômico rentável, não atraindo o interesse de investimentos por instituições financeiras internacionais, ou mesmo da indústria de medicamentos, mesmo sabendo da viabilidade econômica relatada nos estudos (VASCONCELOS, 2016). A seguir, destacamos os principais grupos de doenças negligenciadas, incluindo aquelas ocasionadas por helmintos, fragmentadas de acordo com a classificação apresentada pela OMS (Figura 3). A principal relevância atribuída a este grupo de doenças se dá pela elevada morbidade frequentemente observada, além do impacto econômico global envolvido, cujos valores, variam em função a região estudada, sendo influenciada por alguns elementos determinantes, como o desenvolvimento econômico e fatores comportamentais, que tornam uma determinada população mais susceptível a aquisição de doenças.

Figura 3. Principais doenças negligenciadas classificadas pela Organização Mundial da Saúde. Fonte: Vasconcelos et al. (2016).

Doenças Negligenciadas	
*Helmintos	Ascaridíase; tricuriase; ancilostomíase/necatoríase; estrogiloidíase; toxocariase; filariose linfática; oncocercose; dracunculíase, esquistossomose; teníase; equinococose.
Protozoários	*Leishmaniose; *Doença de Chagas; *trípanossomíase humana africana; amebíase; giardíase; balantidíase.
Bactérias	Bartonelose; tuberculose bovina; *úlceras de Buruli; *lepra; leptospirose; febre reumática; *tracoma; *treponematoses.
Vírus	*Dengue; febre amarela; raiva; *febre hemorrágicas.
Fungos	Paracoccidioidomicose
Ectoparasitas	Sarna; míase; tungíase.
*Doenças negligenciadas (OMS 2015)	

2.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS GEO-HELMINTOS: PANORAMA ATUAL NA AMÉRICA LATINA E BRASIL

Parasitas gastrointestinais incluindo geo-helmintos causam considerável morbidade em todo mundo, especialmente em comunidades de baixa renda. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2001), tais agentes infecciosos configuram entre os mais prevalentes e comuns nos seres humanos, sobretudo em países em desenvolvimento, resultando em uma carga global de doenças superior à malária e tuberculose (BETHONY et al., 2006). Pelo fato de apresentar parte do desenvolvimento ontogênico no solo, o clima é um determinante importante na transmissão dessas infecções, onde a umidade e temperatura exercem papel decisivo nesta etapa, contribuindo diretamente ao desenvolvimento larval e embriogênese parasitário. Além do clima, aspectos socioeconômicos como ausência de saneamento básico e suprimento inadequado de água também apresentam relevância, por favorecer a disseminação de estruturas infectantes no meio, aumentando o risco de exposição e infecção em humanos (DE SILVA et al., 2003). Entretanto, são frequentes os relatos de prevalência de infecções por geo-helmintos em áreas urbanas, especialmente por *A. lumbricoides*, semelhantes ou mesmo superiores à de áreas rurais adjacentes em vários países de terceiro mundo (FERREIRA et al., 1991).

Entre as doenças ocasionadas por geo-helmintos três apresentam importância principal em função as elevadas prevalências registradas no mundo: ascaríase, tricuriase e ancilostomíase. Estimativas globais sugerem que *Ascaris lumbricoides* infecta cerca de 1221 bilhões de pessoas, *Trichuris trichiura*, 795 milhões e *Ancilostoma duodenale* em torno de 740 milhões. Estas infecções são registradas mais comumente nas Américas, China e África (DE SILVA et al., 2003). Na América Latina, dados atualizados apontam número de infecção variando em torno de 84 milhões para *A. lumbricoides*, 100 milhões para *T. trichiura* e 50 milhões para *A. duodenale* (SABOYÁ et al., 2013). Embora infecções causadas por este grupo de parasitos estejam associadas com efeitos deletérios crônicos, especialmente em crianças, poucos países da América Latina têm implementado pesquisas nacionais sobre a intensidade e prevalência de infecção. Nessas regiões é comum a ocorrência de poliparasitismo, onde um determinado indivíduo é frequentemente acometido por diferentes espécies parasitárias resultando em quadros de desnutrição, retardo de crescimento, déficits cognitivos e intelectuais, além de retardo mental (DRAKE et al., 2000). Apesar do significativo impacto associado à saúde pública, ainda hoje estas enfermidades permanecem negligenciadas pela comunidade médica e internacional contribuindo para subnotificação de

novos casos.

Saboyá et al. (2013) fornecem dados atuais sobre distribuição, prevalência e intensidade de infecção por geo-helminhos na América Latina. Como principais achados destaca-se a ocorrência de uma taxa de prevalência superior a 50% no Brasil, Venezuela, Equador, Haiti, Guatemala, Bolívia e México (Figura 4). Em relação a faixa etária, maior incidência foi registrada em crianças em idade escolar, diminuindo gradativamente naquelas com idade superior a 16 anos. Além disso, os resultados apresentados indicam maior prevalência de infecção para *A. lumbricoides*, variando entre 40 a 45% dos quadros de infecção induzidos por geo-helminhos, seguido por *T. trichuira*, com 35,5% dos casos, e finalmente *A. duodenale*, com uma de prevalência variando em torno de 19,5%. Segundo os autores, vários fatores contribuem para o cenário epidemiológico constatado na América Latina, ressaltando além da pobreza, a precariedade das condições de higiene e saneamento. Para Costa et al. (1998) entre os múltiplos aspectos que influenciam diretamente a prevalência das geo-helminhos no Brasil, destacam-se além da área geográfica, o tipo de comunidade, o nível socioeconômico, a acessibilidade de bens e serviço, estado nutricional e idade. Esta condição é observada em especial para infecções envolvendo *A. lumbricoides*, cuja frequência é significativamente maior em crianças, resultando como consequência, em alterações patológicas e clínicas mais relevantes. No Brasil, diversos estudos realizados em crianças com idade escolar e pré-escolar mostraram prevalência elevada para esta parasitose (MONTEIRO et al., 1988; COSTA-MACEDO et al., 1998).

Campos et al. (2002), por meio da utilização de técnicas de geoprocessamento e geoestatística, determinaram a distribuição espacial da infecção por *A. lumbricoides* no Brasil e estimaram áreas potencialmente relacionadas a surtos de infecção por este parasito (Figura 4). O resultado desse estudo indicou uma prevalência em torno de 27,5%, no qual, a renda familiar, o nível de escolaridade e as condições peridomiciliares foram identificados como os principais fatores associados à ocorrência da ascaríase.

Figura 4. Prevalência das principais geo-helmintíases (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Ancilostoma duodenales*) na América Latina, baseado em pesquisa bibliográfica para região. Fonte: (OPAS 2009).



Assim, em razão da elevada prevalência de infecção registrada na América Latina, associada às possíveis alterações patológicas, em 2001 a Assembleia Mundial da Saúde aprovou a resolução WHA/54,19, no qual sugere a todos os estados membros, onde infecções por geo-helmintos são frequentes, a atingir uma meta mínima de administração regular de quimioterápicos de pelo menos 75% até 2010 (OMS, 2001).

Em outubro de 2009, o conselho da Organização Pan-Americana de Saúde aprovou a resolução CD49, R19 afirmando o compromisso da agência em reduzir ou eliminar doenças negligenciadas nos Estados membros, incluindo as geo-helmintos, em níveis tais que não seriam mais consideradas problema de saúde pública em 2015, ajudando a alcançar metas de desenvolvimento do milênio (OPAS, 2009). Segundo a resolução, o objetivo principal a ser alcançado em 2015 era reduzir a prevalência entre crianças em idade escolar de 50% para menos do que 20%. A resolução também menciona intervenções para alcançar a meta de controle dessas parasitoses, especialmente aquelas relacionadas com a melhoria do acesso a água potável e saneamento básico, quimioterapia preventiva e educação em saúde por meio de colaborações intersetoriais.

2.3 PARASITOS COMO INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL PROPOSTOS NA LITERATURA

O meio ambiente pode ser enquadrado como importante veiculador de doenças para humanos e animais, por guarnecer de condições intrínsecas ideais ao desenvolvimento e manutenção de ciclos parasitários. Nesse contexto, áreas de recreação representadas por matrizes ambientais de contato primário, podem ser responsáveis pela transmissão de inúmeras zoonoses, especialmente quando frequentado por animais e pessoas. Tal aspecto ressalta a importância de estudos focados no monitoramento periódico desses locais, auxiliando a identificação das espécies parasitárias mais frequentes, e ao mesmo tempo, contribuindo para a determinação de bioindicadores de condições sanitárias, uma vez que, a resolução atual apresentada pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), designa apenas padrões sanitários para coliformes totais encontrados na água.

Assim, em função dessa importante lacuna existente na literatura, trabalhos voltados para a determinação de parâmetros parasitológicos em matrizes ambientais têm sido abordados, como iniciativa para embasar outros bioindicadores, complementando a legislação vigente. Tais estudos têm documentado a contaminação de areia por ovos e larvas de diferentes espécies parasitárias com potencial zoonótico, colocando em risco a saúde do homem (DUNSMORE; THOMPSON, 1984).

Entre os agentes parasitários mais comumente encontrados em matrizes ambientais, solo e areia, destacam-se: *A. lumbricoides*, *A. braziliensis*, *Strongiloides stercoralis* e *T. trichuira*. Estes organismos utilizam frequentemente cães e gatos como hospedeiros naturais, podendo acidentalmente infectar humanos resultando em inúmeros agravos a sua saúde. Tal fato decorre em razão ao padrão de desenvolvimento apresentados por estes parasitos, cujas formas infectantes são formadas no ambiente, a partir das excretas liberadas pelo hospedeiro natural.

Segundo a literatura, estudos têm apontado a participação de parques, praças públicas, *playgrounds* e areia de praias como importantes elementos envolvidos na cadeia de transmissão de doenças, especialmente ocasionadas por geo-helminthos (CÁCERES et al., 2005; MORO et al., 2008). Nesta esfera, a população infantil corresponde ao grupo mais susceptível, pois são as mais expostas ao solo contaminado quando em atividade recreativa e por apresentarem distúrbios de perversão de apetite como geofagia e onicofagia (hábito de roer unhas), facilitando a ingestão de ovos e outras estruturas parasitárias infectantes.

Em relação às metodologias preconizadas nesses estudos de monitoramento ambiental,

destacam-se o emprego de técnicas coproparasitológicas tradicionais, em função do baixo custo e fácil aplicação. Estas técnicas, apresentam limitações de uso, cuja eficiência, depende de múltiplos fatores, ressaltando além da carga parasitária contaminante, o grau de preservação das estruturas recuperadas, uma vez que o diagnóstico é estabelecido exclusivamente a partir de aspectos morfológicos (AMARAL, 2012). Abaixo, listamos uma série de estudos que validam a utilização desses métodos, contribuindo diretamente para a determinação de novos parâmetros sanitários.

A contaminação de solos por parasitos gastrointestinais de cães na cidade de Bucareste na Romênia, foi documentada (TUDOR, 2015). No presente estudo o método utilizado para a detecção das estruturas parasitárias foi a técnica de flotação com solução hipersaturada de cloreto de sódio (NaCl), onde a identificação se deu a partir das características morfológicas apresentadas por Mitrea (2011). Os resultados apresentados indicaram um grau de prevalência de 22,22% de positividade nos locais amostrados, indicando a presença de pelo menos uma espécie parasitária. Exames de microscopia permitiram identificar ovos de *Toxocara* spp. em 17,77% das amostras, *A. lumbricoides* em 15,21% e *T. trichuira* em 8,88% das amostras analisadas. Contaminações por duas espécies parasitárias foram registradas em 13,33% dos casos.

No Brasil, dados apresentados por Mandarino-Pereira et al. (2010) indicaram um infectividade em 22,4% das amostras analisadas. Neste caso, as técnicas utilizadas para determinar a prevalência de parasitos no solo foram a de Rugai, para a detecção de ovos, e o método de Baermamn, para a recuperação de larvas. Em relação às espécies parasitárias mais prevalentes registradas pelos autores, maiores índices foram detectados para *Ancylostoma* spp. presentes em 13,6% das amostras estudadas e *A. lumbricoides*, com prevalência de 17,22%. No ano seguinte, Cassenote et al. (2011) determinaram a frequência de geo-helminthos com potencial zoonótico em solos de praças públicas e escolas municipais infantis de Fernandópolis, estado de São Paulo. Das 225 amostras analisadas, 30,2% (68 amostras) foram positivas para parasitos. Nas amostras provenientes de praças públicas, a prevalência foi de 40%, enquanto que, nas escolas, foi de apenas 6,1%. O espécime parasitário mais incidente no estudo foi representado pelo *Toxocara* spp. presente em 79,3% das amostras analisadas, seguido por *Trichuris* spp. 13,8% e ancilostomídeos, 6,9%. Para os autores, variáveis relacionadas ao local como o número de cães, utilização de cercas e saneamento básico tiveram impacto direto na contaminação do solo. Demais estudos realizados no Brasil, indicam índices de infectividade ambiental por parasitos zoonótico de 36% (SPRENGER et al., 2014), 44% (de MOURA et al., 2013) e 78,6% (MARCHIORO et al., 2014).

Um dos resultados mais atuais sobre esta temática foi publicado por Amaral et al. (2015), ao estudar indicadores parasitológicos de contaminação ambiental em areias de praias do Rio de Janeiro. Neste estudo, os autores monitoraram areia de praia de duas ilhas na Baía de Guanabara, por métodos tradicionais (Lutz e Baermann) e por teste imunológico de ELISA, com o objetivo de determinar o nível e a sazonalidade desta contaminação. Entre os gêneros detectados, *Ascaris* spp. e *Ancylostoma* spp. ocorreram em maior frequência, funcionando como importantes marcadores biológicos de contaminação ambiental. Adicionalmente, o estudo ainda relata a sensibilidade apresentado pelo teste imunoenzimático de ELISA na detecção de estruturais parasitárias, em especial, cistos e oocistos de *Giardia intestinalis* e *Cryptosporidium* spp. respectivamente, ressaltando o emprego dessa técnica no monitoramento de ambientes públicos. Os dados apresentados nesse estudo contribuíram para a elaboração do projeto lei N° 585/2015, junto à Assembleia Legislativa do Estado do Rio de Janeiro (ALERJ), que normatiza entre outros, o monitoramento da qualidade da areia de praças públicas, parques, escolas e áreas destinadas ao lazer, como base ao controle de bioagentes de importância em saúde pública. Em relação aos valores numéricos dos biomarcadores de saúde ambiental estipulados pelo Departamento de Saneamento e Saúde ambiental da ESNP/FIOCRUZ, ressalta-se:

I - Ausência de ovos e larvas de parasitos;

II – Coliformes totais (UFC/g de areia);

Tabela 2. Valores numéricos dos biomarcadores de saúde ambiental . Fonte: Amaral, 2012

Classificação	Cruzes	Coliformes totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)
Excelente	++++	Até 46,14	Até 0,46
Muito Boa	+++	Mais que 46,14 a 92,29	Mais que 0,47 a 0,92
Satisfatória	++	Mais que 92,29 a 138,44	Mais que 0,93 a 1,85
Imprópria	+	Acima de 138,44	Acima de 1,85

Embora tais estudos validem a utilização desses métodos no monitoramento ambiental, sabe-se das limitações impostas ao seu uso, destacando a necessidade de atuar no desenvolvimento de novas metodologias que permitam, não apenas detectar parasitos, mas

também, possíveis fontes de contaminação.

Entre as novas propostas metodológicas voltadas para o diagnóstico parasitológico em amostras ambientais, destaca-se a detecção molecular específica pela PCR, por permitir atuar no estudo da genotipagem, contribuindo para melhor compreensão dos aspectos epidemiológicos envolvidos no aparecimento e dispersão dos agentes parasitários (GRECA, 2010).

Como método de diagnóstico, a PCR apresenta vantagem sobre as demais técnicas, apresentando maior sensibilidade na detecção de agentes infecciosos. O segredo está na capacidade de amplificar sequências precisas do DNA, por meio de uma reação que utiliza como elementos básicos no processo uma DNA polimerase termoestável, oligonucleotídeos para iniciar a síntese de DNA, cátion bivalente de Mg^{2+} , entre outros. A especificidade e a sensibilidade da PCR têm levado sua utilização para detectar parasitos tanto em amostras clínicas, quanto ambientais (BRANCO et al., 2012).

Lowery et al. (2001) utilizaram a PCR em amostras de água de consumo na Irlanda do Norte, para detectar *Cryptosporidium* spp. após separação imunomagnética. Os resultados confirmam elevada sensibilidade e especificidade da técnica, além da capacidade de fornecer de forma rápida a genotipagem dos parasitos. Smith et al. (2006) também se referem a PCR como uma técnica viável para monitorar agentes parasitários em amostras ambientais, permitindo caracterizar fontes de infecção e possíveis fatores envolvidos na dispersão desses agentes no meio. No que se refere à sensibilidade da técnica, esses autores mostraram que a Nested-PCR foi capaz de detectar molecularmente, quantidades extremamente pequenas de parasitos no meio. Para os autores, a maximização dos resultados decorre da re-amplificação do material genético, aumentando assim, a sensibilidade da técnica, condição também documentada por Pereira (2007). Neste estudo foi demonstrado que a sensibilidade da técnica de PCR depende diretamente da quantidade do material contaminante no meio. No entanto, quando aplicada a Nested-PCR, permitiu melhorar significativamente a sensibilidade método, sendo possível identificar até 10^2 oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água, enquanto que a PCR simples, resultou em bandas amplificadas de DNA apenas em amostras com 10^5 e 10^6 oocistos do parasito, concentrações bem superiores. Aspectos similares foram encontrados por Nikaeen et al. (2005), ao demonstrarem experimentalmente a sensibilidade do Nested-PCR para detecção de oocistos de *C. parvum* em amostras de água. Os resultados indicaram elevada sensibilidade da técnica, com o produto de amplificação claramente visível no gel de agarose, mesmo quando em concentrações elementares.

2.4 LEGISLAÇÕES SOBRE A QUALIDADE DA AREIA

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) recomendou aos órgãos ambientais a avaliação da qualidade parasitológica e microbiológica da areia para futuras padronizações, por meio da Resolução Nº. 274/00 no oitavo artigo, que classifica as águas em doces, salobras e salinas destinadas à balneabilidade. Por aquela ocasião a Secretaria Municipal de Meio Ambiente da Cidade do Rio de Janeiro (SMAC) editou a resolução nº 081/00, com caráter provisório de dois anos e que tratava apenas das condições bacteriológicas, não realizando análise para fungos e parasitos, e não estabelecia indicadores e os respectivos limites para estes microrganismos, os quais também são importantes patógenos de areia. A lei Municipal do Rio de Janeiro Nº 3.210 de 5 de abril de 2001, classifica a areia como imprópria, quando a mesma apresenta larvas e ovos de parasitos em quantidade e qualidade que possam provocar risco à saúde humana. Segundo SARQUIS (2003) poucas são as referências sobre a microbiota específica da orla litorânea brasileira, e da sua areia de praias. Apesar do órgão ambiental municipal do Rio de Janeiro ter sido de vanguarda na edição de normatizações de avaliação e monitoramento da qualidade sanitária das areias das praias do RJ, mesmo com a edição da nova resolução Nº 468/10 da SMAC, após trabalho realizado por uma empresa terceirizada (COHIDRO CONSULTORIA ESTUDOS PROJETOS) que acompanhou por 4 anos apenas a qualidade sanitária bacteriológica das areias de 23 praias do RJ (10 de 35 pontos de coletas são nas praias e ilhas pertencentes a Baía de Guanabara) em moldes metodológicos semelhantes aos realizados na antiga resolução. Não sendo executada a avaliação das condições sanitárias quanto à presença de fungos, parasitos e vírus, como era esperado. Portanto, a resolução ainda está incompleta do ponto de vista microbiológico e há ainda uma série de ressalvas para serem testadas pela comunidade científica, que apesar do espaço temporal entre a antiga resolução e a nova, metodologicamente não foram incorporadas aos avanços científicos nesta área. Ressalta-se a importância de padrões nacionais, que deveriam ser editados pelo órgão superior brasileiro, o CONAMA, como ocorre nos países desenvolvidos, normatiza os padrões sanitários de avaliação da qualidade sanitária desses espaços de uso pela população.

2.4.1 NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO

A Lei Orgânica Municipal do Rio de Janeiro No 3210/2001 criou a obrigatoriedade da divulgação da qualidade da areia das praias, e em seu artigo 9 garante a participação da coletividade na formulação de políticas públicas e nos planos e programas. E no artigo 464 estabelece que a população deve ser informada pelo poder executivo com sinalização de advertência sobre a existência de perigo para a saúde nos locais de despejos de esgoto sanitário, industrial ou patógenos. Contudo devido a inúmeras ligações clandestinas nem sempre isso ocorre, e por este motivo o monitoramento dos ecossistemas constituem elementos de grande importância para cumprir este direito do cidadão carioca.

Descrição da lei orgânica do Município do Rio de Janeiro - *Capítulo II – Dos Direitos Fundamentais no Art. 9º: “O Município assegurará e estimulará, em órgãos colegiados, nos termos da lei, a participação da coletividade na formulação e execução de políticas públicas e na elaboração de planos, programas e projetos municipais”. E no Capítulo VI - Do Meio Ambiente, na seção II Do Controle e da Preservação do Meio Ambiente, no Art. 464 – “O Poder Executivo é obrigado a manter a sinalização de advertência nos locais de despejo de esgotos sanitários, industriais ou patológicos, com o fim de esclarecer a população sobre a sua existência e os perigos à saúde”.*

De acordo com a Lei 2.358/95 é proibido à presença de cachorros nas areias das praias, mas por falta de fiscalização e de educação ambiental não existe consciência do risco que essa atitude pode trazer à saúde de seus frequentadores. E também se verifica que na maioria das vezes os animais que mais oferecem risco nesses ambientes não são os que possuem uma casa e um dono que cuida deles e os mantém saudáveis, e sim os animais de rua, que são responsabilidade do Estado e são os mais observados nas praias e praças. E pouca fiscalização de controle de zoonoses é observada em relação aos animais sobre a responsabilidade do Estado, sendo geralmente frequentes na observação de campo em areias das praias, ratos, pombos, urubus, cães e gatos.

A avaliação das condições sanitárias de areia para os padrões colimétricos é realizada pela SMAC na Resolução N° 468/2010.

A Resolução N° 468/2010, estabelece limites máximos para classificação das areias para recreações de contato primário, não recomendando o contato com areias nas quais tenham sido determinadas concentrações superiores a 3800 UFC *E. coli* por 100 g. A escolha desse valor foi baseada nos resultados das análises realizadas na areia de uma praia considerada limpa e sem influência de urbanização.

A tabela 3 apresenta os padrões estabelecidos nesta Resolução, expressos em UFC/g de areia.

Tabela 3. Classificação para Coliformes totais e *Escherichia coli* segundo modificação a partir da Resolução Nº 468/2010, da Secretaria Municipal de Meio Ambiente da Cidade do Rio de Janeiro, dados expressos em UFC/g. Fonte: Resolução Resolução Nº 468/2010 modificada baseada nos dados do trabalho de Gronewold e Wolpert (2008).

Classificação	Coliformes totais	<i>E. coli</i>
Ótima	0 a 46,14	0 a 0,18
Boa	46,15 a 92,29	0,19 a 1,85
Regular	92,30 a 138,44	1,86 a 17,54
Não recomendada	> 138,44	> 17,54

2.4.2 PADRÕES INTERNACIONAIS

O estudo realizado por Mendes et al. (1993), em Portugal, propôs valor de 100.000 UFC de coliformes fecais em 100 g de areia e 10.000 UFC em 100 g de Enterococos. Em 2008 uma organização não governamental europeia, a Associação Bandeira Azul da Europa (ABAE, 2008), propôs Valores Máximos Admissíveis para *E. coli* e Enterococos de 2000 UFC em 100g de areia seca.

2.5 NEMATÓIDES

2.5.1 *Ascaris lumbricoides*

Ascaris lumbricoides é um parasito gastrointestinal de humanos que tem o intestino delgado, o sítio de infecção final. Este nematoide configura como o mais prevalente em todo mundo, acometendo principalmente crianças com idade escolar (GODINHO, 2003). Estudos epidemiológicos registram maiores prevalências em regiões tropicais e subtropicais, além de locais com saneamento inadequado, condições que favorecem simultaneamente a completa segmentação da célula ovo e a ampla dispersão de estruturas parasitárias infectantes no meio (BASSO et al., 2008). Apesar da elevada prevalência conferida, ocasiona frequentemente quadros assintomáticos, não resultando em alterações clínicas relevantes em seu hospedeiro. Nos Estados Unidos a ascaríase é a terceira infecção helmíntica mais frequente, sendo

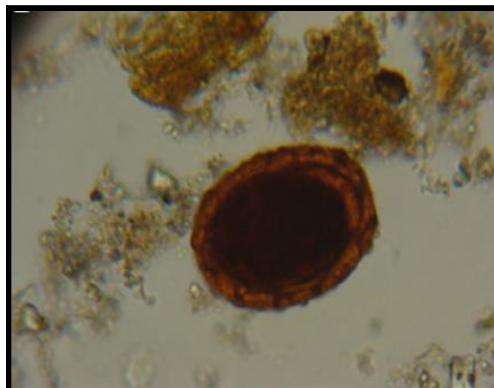
excedida apenas por *T. trichuira* e *A. duodenale* (SELTZER, 1999).

Taxonomicamente, estão alocados na família Ascarididae e ordem Ascaridida (REY, 2008). Integram este táxon nematoides de grande porte que caracterizam-se entre outros aspectos morfológicos, a presença de um acentuado dimorfismo sexual, onde fêmeas mostram-se maiores e mais robustas em relação aos machos, asas cervicais são ausentes, interlábios presentes, além de um sistema digestivo completo, guarnecido de uma abertura oral, esôfago, alças intestinais e abertura anal nas fêmeas. Machos sem projeções digitiformes apresentam ainda asas caudais menores e mais delgados em comparação as fêmeas. Como anexos genitais masculinos, encontram-se dois espículos grossos, curvos e iguais, que podem ser projetados para fora da cloaca ou ficar retraídos, pela ação de músculos implantados em sua base (REY, 2008).

2.5.2 CICLO BIOLÓGICO DE *ASCARIS LUMBRICOIDES*

Biologicamente, apresentam um ciclo monoxênico, envolvendo a participação de um único hospedeiro. O ciclo inicia com a presença de espécies adultas implantadas na parede duodenal do hospedeiro, por meio dos grandes lábios que circunda a abertura oral. Após a cópula, por fecundação cruzada, a fêmea inicia a etapa de oviposição, caracterizada pela deposição de ovos férteis no lúmen intestinal. Estes ovos apresentam internamente uma célula germinativa não-segmentada, com citoplasma finamente granuloso, envolvidos por uma casca espessa constituídas por três camadas (Figura 5).

Figura 5: Microscopia de luz realizada em matrizes ambientais (areias) naturalmente contaminadas por ovos férteis de *Ascaris lumbricoides*. Fonte: Amaral, 2012.



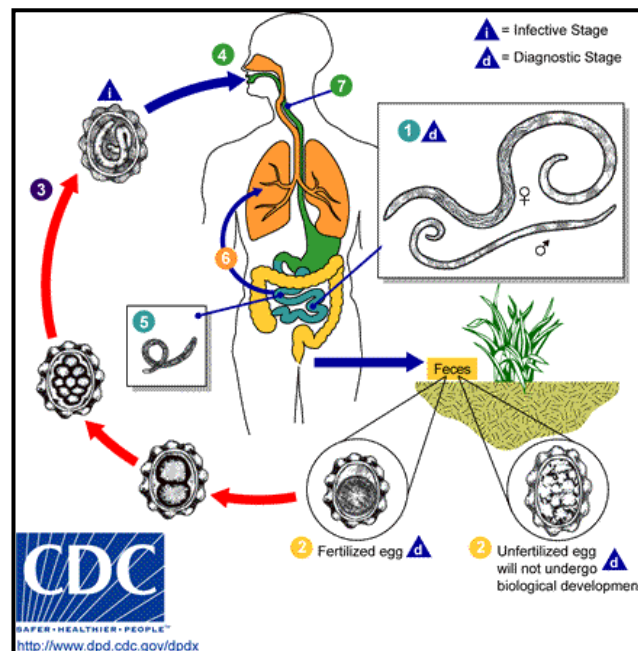
O embrionamento dos ovos ocorre no meio externo e requer condições ambientais favoráveis destacando a presença de oxigênio, elevada temperatura e umidade. Em temperaturas ótimas, entre 20 e 30°C, o completo desenvolvimento embrionário pode fazer-se em duas semanas, resultando na formação de estágios larvais L₁. Esta etapa é seguida pela ocorrência de uma muda, formando no interior do ovo, estágios larvais infectantes representados por formas L₂. A infecção do hospedeiro susceptível ocorre exclusivamente por uma via oral, por meio da ingestão acidental de ovos infectantes presentes na água, verduras, frutas e outros.

Após a ingestão, dá-se a eclosão das formas larvais, processo esse auxiliado pelo gradiente de CO₂ gerado no interior das alças intestinais do hospedeiro, além da ação de enzimas que compõem o suco gástrico do hospedeiro. Uma vez presentes no lúmen intestinal, estágios L₂ inicia um longo percurso migratório pelos tecidos do hospedeiro, até tornar-se completamente adaptada para viver em seu hábitat final, representada pelo intestino delgado. Este comportamento migratório apresentado pelas formas infectantes decorre em razão as suas características metabólicas, uma vez que, nesta etapa o metabolismo oxidativo parasitário é mantido exclusivamente por vias aeróbias, no qual o ciclo de Krebs e a cadeia transportadora de elétrons exercem participação central.

A penetração larval por meio do revestimento intestinal se dá pela ação conjunta mediada por secreções enzimáticas antigênicas e pelos danos espoliativos causados mecanicamente na parede do intestino. Uma vez na corrente sanguínea, atingem o fígado, coração e pulmões, onde sofrem mudanças de cutícula por meio de mudas sequenciais, gerando no interior dos alvéolos estágios L₄. Permanecem nos alvéolos pulmonares por período restrito, passando em sequência para os brônquios, traqueia, faringe e finalmente laringe (REY, 2003).

Em seguida são deglutidas, atingindo o intestino delgado do hospedeiro onde evoluem até formas adultas. O desenvolvimento sexual completa-se em cerca de dois meses e, em geral, aos dois meses e meio as fêmeas começam a pôr os ovos (Figura 6).

Figura 6. Ciclo biológico ilustrativo da espécie *Ascaris lumbricoides*. Formas adultas parasitárias (1) vivendo no lúmen do intestino delgado. Fêmea de elevado potencial biótico, produzindo aproximadamente 200000 ovos por dia liberados junto às excretas do hospedeiro (2). Ovos férteis embrionados com presença de estágios larvais infectantes, estágios L₂ (3), aproximadamente 4 semanas no ambiente, variando em função aos fatores abióticos (temperatura, umidade e disponibilidade de oxigênio). Após a ingestão de ovos infectantes (4), observa-se a eclosão de larvas L₂ (5), o qual invade a mucosa intestinal, e por meio do sistema porta, alcançar os pulmões (6). Estágios larvais L₄ nos pulmões (10-14 dias) após a infecção penetrando a parede alveolar e iniciando migração ascendente pelo conduto brônquio-alveolar do hospedeiro até a faringe. Desenvolvimento final no lúmen intestinal (1).
 Fonte: CDC, 2016.



2.5.3 MECANISMOS DE TRANSMISSÃO DE *Ascaris* sp.

Um indivíduo portador da ascariase é capaz de eliminar diariamente milhares de ovos em suas fezes. Tal tendência decorre em razão ao extraordinário desenvolvimento do sistema reprodutor feminino, que ocupa grande parte da cavidade pseudocelômica do parasito, resultando uma produção diária de aproximadamente 200000 ovos. Em locais sem saneamento básico adequado, estas fezes acabam por contaminar o solo e a água, favorecendo a dispersão de estruturas parasitárias. A transmissão da ascariíase ocorre quando uma pessoa sadia ingere acidentalmente esses ovos no ambiente (SARINAS, 1997).

Nesse contexto, são as crianças em idade escolar e pré-escolar, as mais pesadamente infectadas, assumindo, portanto, maior importância epidemiológica. Estas adquirem a

infecção ao brincar em ambientes contaminados contendo estruturas parasitárias infectantes, representadas por ovos larvados (JARDIM-BOTELHO et al., 2008). Assim, mãos sujas podem levar os ovos diretamente a boca ou contaminar brinquedos ou objetos, que entrarão em contato com outras crianças, favorecendo a dispersão da parasitose.

Uma vez no ambiente, esses ovos podem permanecer viáveis por vários anos, colocando em risco a saúde de outras pessoas. Esta resistência decorre da proteção conferida pela casca espessa e impermeável da estrutura, assegurando maior viabilidade da larva infectante mesmo quando as condições ambientais não são favoráveis. Em condições ideais, podem permanecer infectantes no solo por vários meses, entretanto, ações como filtragem da água e cozimento de alimentos, garantem a completa remoção e inviabilização dos ovos impedindo novas infecções (ASAOLU et al., 1991).

2.5.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Ascaris sp.*

Geograficamente, mostra-se presente nas regiões tropicais e temperadas do mundo, porém, apresentando maior incidência em áreas de clima quente e úmido, bem como onde as condições higiênicas da população são mais precárias. Tais fatores, além de contribuir diretamente para o desenvolvimento parasitário, garante maior dispersão de estruturas infectantes no meio, predispondo a infecção de novos hospedeiros susceptíveis (de SILVA et al., 1997).

Em muitos países da América Latina, particularmente México, Guatemala, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia, a prevalência é da ordem de 50 a 75% da população examinada, com índices de parasitismo mais baixos nas grandes ilhas do Caribe, Republica Dominicana e em Porto Rico. No Brasil, exames coproparasitológicos realizados anualmente pelos serviços de saúde, revelaram prevalência em torno de 36% da população estudada, com tendência de declínio nos anos sucessivos (de SILVA et al., 2003; REY, 2008).

Silva et al (2011) em um estudo transversal realizado no estado do Maranhão, revelam dados atualizados sobre o parasitismo por *A. lumbricoides* e seus impactos epidemiológicos em crianças do estado. Segundo os autores, entre as diferentes parasitoses presentes, a ascaridíase é aquela que apresenta maior importância em saúde pública, em razão a elevada incidência registrada e pela morbidade causada. Como principais resultados destaca-se coeficiente geral de prevalência superior a 53% das amostras estudadas, com maior incidência registrada em crianças com idade escolar (4-10 anos). A partir da análise dos questionários, pode-se observar resultados alarmantes no que diz respeito ao alto grau de insalubridade ao qual a população está inserida, bem como seus precários hábitos de higiene, fatores que

contribuem para o cenário epidemiológico constatado. Os resultados apresentados nesse estudo foram similares àqueles publicados por Pereira et al. (2003) no estado de Sergipe. Nestes e em outros estudos realizados no Brasil, as condições higiênico-sanitárias se mostraram estritamente relacionadas com altas prevalências de parasitos intestinais (BATISTA et al., 2006; SILVA et al., 2005).

2.6 PROTOZOÁRIO

2.6.1 *Giardia intestinalis*

A giardíase é uma parasitose intestinal amplamente distribuída pelo mundo, com alta prevalência em países em desenvolvimento, inclusive o Brasil. Embora seja uma infecção com bom prognóstico, pode apresentar gravidade em pessoas com desnutrição, fibrose cística ou algumas imunodeficiências. Apresenta como agente causal, *Giardia intestinalis*, protozoário de desenvolvimento extracelular que acomete principalmente porções superiores do intestino delgado. Constitui causa muito frequente de doença diarreica em grande variedade de espécies animais, incluindo o homem, resultando frequentemente em quadros assintomáticos (SAVIOLE et al., 2006; GEURDEN et al., 2010). Por ser um parasito frequente em grande parte do planeta, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a giardíase no grupo de doenças negligenciadas (HOLLM-DELGADO et al., 2008).

A aquisição da giardíase ocorre exclusivamente por via oral, a partir da ingestão de estruturas parasitárias infectantes representadas por cistos tetranucleados, por meio da água ou de alimentos contaminados, ou ainda envolvendo uma via feco-oral direta (COTTON et al., 2011).

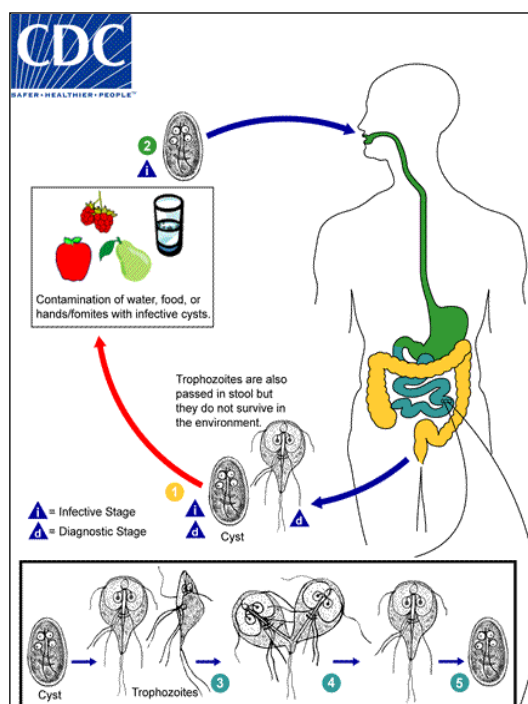
2.6.2 O AGENTE E SEU CICLO BIOLÓGICO

Trata-se de um pequeno protozoário flagelado, que durante seu ciclo vital apresenta duas formas evolutivas: trofozoítas e cistos. O trofozoíto mede 20 por 10 μ m, existindo de cada lado um disco em forma de ventosa, por meio do qual se fixa à superfície das células da mucosa intestinal, sendo encontrado em toda a extensão do duodeno. Enquanto que os cistos são elípticos ou ovoides e medem cerca de 10 μ m. Nas preparações coradas por hematoxilina, observa-se que as estruturas internas estão duplicadas em relação às do trofozoíto, destacando principalmente a presença de quatro núcleos, aproximadamente circulares e com cariossomo central, axóstilo e corpos parabasais.

Possui ciclo biológico monoxênico, por envolver a participação de um único

hospedeiro. Após a ingestão, os cistos se rompem no duodeno, formando trofozoítos, os quais se multiplicam intensamente. A reprodução realiza-se assexuadamente, por divisão binária longitudinal simples, sendo um processo relativamente complexo. Os cistos são eliminados pelas fezes em grande quantidade (300 milhões a 14 bilhões por dia), ocorrendo períodos de interrupção de eliminação de sete a 10 dias. Os trofozoítos também podem estar presentes nas fezes, mas são os cistos os responsáveis pela transmissão. Os cistos resistem fora do hospedeiro, sobrevivendo em água doce e fria. Entretanto, toleram o aquecimento, a desidratação e a exposição prolongada às fezes (WARD, 2009) (Figura 7).

Figura 7. Ciclo biológico ilustrativo de *Giardia intestinalis*. (1) presença de estruturas infectantes, cistos tetranucleados. (2) possíveis formas de transmissão. (3) etapa de multiplicação assexuada por divisão binária. (3) presença de formas proliferativas, trofozoítos. (4) cistos elípticos tetranucleados. Fonte: CDC, 2016.



2.6.3 MECANISMOS DE TRANSMISSÃO DA *Giardia sp.*

Giardia intestinalis é transmitida pela ingestão de cistos tetranucleados presentes no ambiente, envolvendo, portanto, uma via oral (RENDTORFF, 1954). Muitas das informações sobre o modo de transmissão da *Giardia* são obtidas de estudos de infecção e doença, especialmente em países não desenvolvidos (SHAW et al., 1977; LOPEZ et al., 1980. A

transmissão por via aquática é bem documentada, incluindo as atividades aquáticas recreativas como a natação (ISAAC-RENTON, 1992). O baixo inóculo facilita a transmissão de pessoa a pessoa, especialmente entre membros da mesma família e indivíduos em condições de superlotação, onde as práticas de higiene podem estar abaixo do ideal (BLACK et al., 1977; NIGARD et al., 2006). Transmissão envolvendo uma rota alimentar ocorre, porém é pouco frequente (WHITE et al., 1989). Transmissão sexual tem sido reportada, especialmente em homossexuais.

2.6.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA *Giardia sp.*

A giardíase está distribuída por todo o planeta, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil sua prevalência varia de 12,4% a 50%, dependendo do estudo, da região e da faixa etária pesquisada, predominando nas crianças entre zero e seis anos. Estudo feito em Botucatu, SP, revelou acometimento de crianças em faixa etária predominante de um a quatro anos (GUIMARÃES; SOGAYAR, 1995). Pode ser transmitida por ingestão de cistos que contaminam a água e alimentos (via mais frequente), por contato interpessoal e via sexual (sexo anal/oral), a qual é teoricamente possível, mas não plenamente aceita por todos os autores. Aglomerados populacionais com precárias condições sanitárias e o convívio em creches aumentam a disseminação desse enteropatógeno. Em muitas regiões há um pico sazonal simultâneo no verão, relacionado à maior frequência a piscinas comunitárias por crianças de pouca idade, à eliminação de cistos prolongados e a pouca quantidade infectante (SANTANA et al., 2014). As parasitoses intestinais apresentam alta incidência em creches, sendo um fator de risco de infestação de enteropatógenos entre as crianças que as frequentam (REY, 2008). Estudo realizado em praças públicas detectou esse parasito em fezes de cães, demonstrando o risco de contaminação humana, sobretudo de crianças que têm o hábito de brincar no solo e apresentam distúrbios de perversão do apetite, como a geofagia (AMARAL et al., 2015).

Normalmente os cães infectados não manifestam a doença. No entanto, o parasito é comum em cães e também em gatos com sintomas gastrointestinais, como vômito e/ou diarreia. O hábito de defecar em lugares impróprios e com saneamento precário também foi associado à perpetuação do ciclo do agente. Nestes termos, é também importante a atuação de vetores mecânicos, pois o cisto permanece viável no meio ambiente por até 60 dias, sendo destruído em temperaturas superiores a 64°C. Porém sobrevive até 24 horas no trato digestivo de moscas e por vários dias no de baratas (SANTANA et al., 2014).

3 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Esse trabalho irá contribuir com o entendimento epidemiológico das parasitoses nos ambientes estudados, ressaltando sua relevância em questões de saúde.

Algumas doenças parasitárias se tornaram um relevante problema de saúde pública no Brasil e no mundo. São endêmicas principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, comprometendo desproporcionalmente populações desfavorecidas social e economicamente.

Indivíduos que vivem em condições precárias de saneamento básico, de abastecimento de água, de habitação e da falta de hábitos de higiene pessoal e coletiva, são os mais predispostos a adquirir essas doenças. Deste modo, há necessidade de formulação e aplicação de medidas políticas intersetoriais que garantam o acesso universal aos serviços de saúde, de saneamento e promoção de projetos de educação sanitária e ambiental.

Como o diagnóstico de parasitoses por exames coproparasitológicos, e sua associação com a ocorrência de parasitas nas amostras de solo ainda é relativamente pouco investigado. Por isso esse trabalho tem extrema importância, pois buscou avaliar a presença de ovos, cistos ou larvas de parasitas em amostras de areia.

Assim, o melhor entendimento dessa relação, bem como a investigação da prevalência desses parasitos, por métodos mais sensíveis e rápidos e padronizados, que possam estar disponíveis em qualquer laboratório de controle sanitário de rotina, tornam-se imperativos para a avaliação da contaminação do solo e para a adoção de medidas sanitárias adequadas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar por método de biologia molecular, pela técnica de PCR, a detecção de DNA de parasitos em amostras de areia de praias da Baía de Guanabara – RJ, podendo assim, otimizar o diagnóstico de algumas doenças parasitárias em amostras ambientais.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

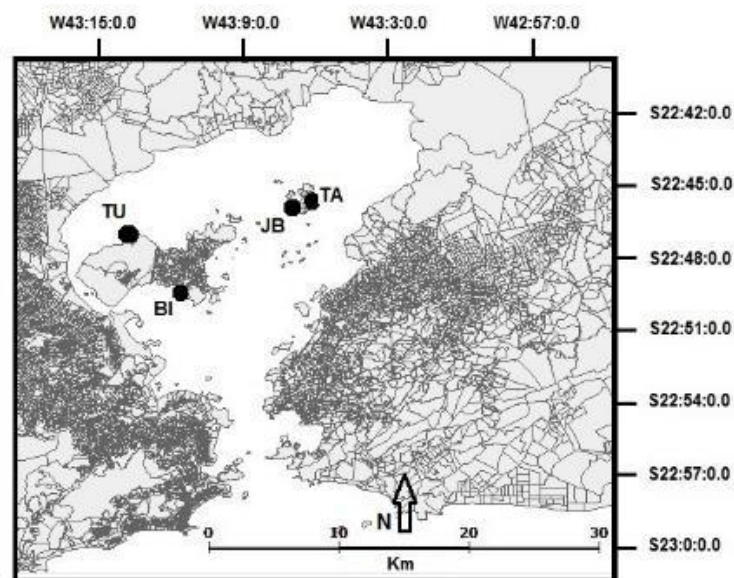
- Avaliar as condições sanitárias de areias das praias da Baía de Guanabara – RJ pelo método otimizado de biologia molecular para parasitos intestinais, visando comparar com os obtidos por métodos tradicionais;
- Analisar o desempenho da PCR para detecção de *Giardia sp.* e *Ascaris sp.* em amostras de areia nas praias estudadas;
- Estudar a presença e distribuição de agentes patogênicos em amostras de areia nas praias estudadas e avaliar a sua relação com parâmetros ambientais;
- Comparar dois tipos de extração de DNA por Kits comerciais otimizando para a utilização em amostras ambientais.

5 METODOLOGIA

5.1 ÁREA DE ESTUDO

Este estudo foi realizado com amostras obtidas de quatro praias da Baía de Guanabara: duas na Ilha do Governador (IG) e duas na Ilha de Paquetá (IP), situadas na cidade do RJ e no Estado do Rio de Janeiro (Figura 8).

Figura 8. Mapa geográfico da Baía de Guanabara - RJ, com destaque para as áreas de coleta das amostras de areia de praia, na Ilha do Governador: TU - Praia do Tubiacanga; BI – Praia da Bica; na Ilha de Paquetá: JB – Praia José Bonifácio; TA – Praia de Tamoios. Fonte: Este trabalho.



Na Ilha do Governador foram definidos como pontos de coletas de amostras, as praias: da Bica (BI) e praia da Ponta do Tubiacanga (TU); e na Ilha de Paquetá foram definidos as praias: José Bonifácio (JB) e dos Tamoios (TA). Foram 129 pontos amostrais no total, na Tabela 4 estão a posição georeferenciada dos locais de coleta:

Tabela 4. Coordenadas dos pontos amostrais

PRAIAS	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA	
	Latitude	Longitude
José Bonifácio	43° 6' 37.953"W	22° 45' 43.498"S
Tamoios	43° 6' 30.166"W	22° 45' 18.899"S
Bica	43° 11' 53.575"W	22° 49' 9.136"S
Tubiacanga	43°13'52.824"W	22° 47' 4.748"S

As áreas de estudo foram escolhidas baseadas no trabalho de Egler et al. (2003), de modo que fossem praias que pudessem representar o ecossistema costeiro da Baía de Guanabara, por esta possuir um espelho d'água bastante diversificado, sendo consideradas as variáveis como circulação das águas, batimetria, situação do entorno, quantidade do material em suspensão, e frequência de moradores nas praias.

5.2 COLETAS DAS AMOSTRAS NOS PERÍODOS DE MONITORAMENTO

Para as análises parasitologias foram realizadas coletas de amostras distribuídas no período de doze meses (2º semestre de 2010 e 1º semestre de 2011), sendo feitas duas campanhas por cada estação do ano, totalizando oito campanhas de amostragem no total. E para as análises parasitológicas, além do terceiro período de coleta (2010 – 2011) foram utilizadas amostras de areia seca coletadas pelo grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Adriana Sotero Martins, no Projeto de Pesquisa financiado pelo CNPq No. 577.432/2008-7, em que este projeto está inserido, sendo o primeiro período de 2008 – 2009 e o segundo período de 2009 – 2010.

As coletas realizadas somando os três períodos de estudo, participou um total de 129 amostras de areia seca. Sendo 58 amostras do primeiro período (2008-2009); 20 amostras do segundo período (2009-2010), este teve menor número de amostras em função de terem sido perdidas durante trocas de material para outras geladeiras; e 51 amostras correspondentes ao terceiro período (2010-2011).

No Quadro 2 estão os dias das coletas de cada campanha realizadas durante todos os três períodos.

Quadro 2. Períodos das Coletas de Amostras nas Praias da Bica (BI), Tubiacanga (TU), José Bonifácio (JB) e Tamoios (TA).

Sequência	Ilha do Governador		Ilha de Paquetá		Campanha	Estação do Ano
	BI	TU	JB	TA		
PRIMEIRO PERÍODO DE COLETA (2008-2009)						
1X	01/07/08		24/06/08		1 ^a .	Inverno
2X	15/07/08		22/07/08		2 ^a .	
3X	05/08/08		12/08/08		3 ^a .	
4X	26/08/08		02/09/08		4 ^a .	
5X	23/09/08		30/09/08		1 ^a .	Primavera
6X	14/10/08		21/10/08		2 ^a .	
7X	04/11/08		11/11/08		3 ^a .	
8X	02/12/08		09/12/08		4 ^a .	
9X	05/01/09		03/02/09		1 ^a .	Verão
10X	10/02/09		17/02/09		2 ^a .	
11X	02/03/09		04/03/09		3 ^a .	
12X	17/03/09		10/03/09		4 ^a .	
13X	07/04/09		31/03/09		1 ^a .	Outono
14X	05/05/09		28/04/09		2 ^a .	
15X	26/05/09		19/05/09		3 ^a .	
16X	16/06/09		08/06/09		4 ^a .	
SEGUNDO PERÍODO DE COLETA (2009-2010)						
1X	17/08/09		18/08/09		1 ^a .	Inverno
2X	24/08/09		25/08/09		2 ^a .	
3X	13/10/09		14/10/09		1 ^a .	Primavera
4X	14/12/09		15/12/09		2 ^a .	
5X	01/02/10		03/02/10		1 ^a .	Verão
6X	15/03/10		17/03/10		2 ^a .	
7X	12/04/10		13/04/10		1 ^a .	Outono
8X	10/05/10		12/05/10		2 ^a .	
TERCEIRO PERÍODO DE COLETA (2010-2011)						
1X	14/09/10		13/08/10		1 ^a .	Inverno
2X	21/09/10		20/09/10		2 ^a .	
3X	07/12/10		06/12/10		1 ^a .	Primavera
4X	13/12/10		14/12/10		2 ^a .	
5X	21/02/11		22/02/11		1 ^a .	Verão
6X	14/03/11		15/03/11		2 ^a .	
7X	09/05/11		10/05/11		1 ^a .	Outono
8X	23/05/11		24/05/11		2^a.	

5.3 PROCESSAMENTO PARA ANÁLISES POR MEIOS TRADICIONAIS

A técnica utilizada para a pesquisa de ovos, cistos e larvas nas amostras de areia seca foi de Lutz (1919) adaptada (Amaral, 2012), devido a sua simplicidade e baixo custo, sendo adaptada para um melhor aproveitamento da matriz ambiental (areia).

5.3.1 TÉCNICA DE LUTZ ADAPTADA (SEDIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA)

Para a detecção e identificação dos organismos presentes em areia seca, foram utilizados 100 gramas de areia. As amostras foram homogeneizadas e, em seguida, transferidas para um recipiente de vidro com 100 mL de detergente neutro comercial a 0,5%. Posteriormente, agitou-se vigorosamente a solução por 5 minutos deixando em repouso para a total decantação do substrato. O sobrenadante foi filtrado em gazes dobradas em quatro para um cálice de sedimentação tendo seu volume completado até 250 mL com água destilada. Esta suspensão permaneceu em repouso por 2 horas sedimentando.

Em seguida foi decantado o líquido sobrenadante até um volume próximo do sedimento. Este foi transferido para um tubo de polipropileno de fundo cônico (tipo Falcon) de 15 mL para uma nova sedimentação. Após 10 minutos, 50 µL do material foi pipetado em lâmina, acrescentada uma gota do Reagente de Lugol, cobrindo-se com lamínula. Sendo confeccionadas cinco lâminas para cada amostra. Examinou-se o preparo ao microscópio em aumentos de 100X e 400X. As medidas foram tomadas com o auxílio de ocular micrométrica.

Primeiramente foi utilizado a técnica de Lutz adaptada para a concentração da amostra ambiental. O sobrenadante da técnica em questão, resultando um volume próximo ao sedimento, com um volume final de aproximadamente 2 mL de amostra, que foi transferido para um microtubo para posteriormente ser feita a extração do DNA para a utilização na Biologia Molecular (PCR) e a realização do método de ELISA (AMARAL, 2012).

5.4 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE DNA POR BIOLOGIA MOLECULAR

Foram utilizados dois kits diferentes para obtenção de DNA, devido a limitações orçamentárias que tivemos durante a execução do projeto. Por isso algumas amostras participaram da comparação dos dois métodos de extração de DNA que tínhamos disponíveis (Método 1 e 2).

- Método 1: Kit QIAamp DNA Stool Mini (otimizado para amostra ambiental)
- Método 2: GeneClean Kit (otimizado para amostra ambiental)

5.4.1 PROTOCOLO QIAAMP DNA STOOL MINI KIT (MÉTODO 1)

Esse kit comercial de extração de DNA foi desenvolvido para ser utilizado com amostras de fezes, de modo que foram realizadas adaptações para uso com amostras ambientais, que possui menor número de unidades de parasitos por grama. O protocolo tem duas etapas, na primeira ocorre o rompimento da célula, e na segunda a purificação do DNA. Para isso, na etapa de lise celular e adsorção de impurezas na matriz utilizou-se maior volume de amostra, que por sua vez foram inicialmente homogeneizadas. Sendo pipetado 0,5 mL da amostra para um tubo novo, adicionado 1,4 mL do Tampão ASL e misturado em Vórtex por 1 min. As suspensões foram aquecidas em banho-maria a 95°C por 5 min. No final foi feita nova mistura em Vortex por 15 seg. Os tubos foram centrifugados por 1 min a 20.000 Xg. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou 1 comprimido do Inhibitex, sendo misturado em Vortex até dissolver o comprimido totalmente. Foi mantido em temperatura ambiente por 1 min. Logo em seguida, foi centrifugado por 3 min a 20.000 Xg. O sobrenadante foi pipetado para novo tubo e descartado o tubo com o precipitado. Centrifugou-se novamente por 3 min a 20.000 Xg, passou o sobrenadante para um novo tubo e descartou-se o precipitado. Pipetou 15 µL de proteinase K em um novo tubo e acrescentou a amostra, adicionou-se 0,7 mL de tampão AL e misturou em vórtex por 15 seg. A amostra foi incubada em banho-maria a 70°C por 10 min.

Na etapa de purificação do DNA, adicionou-se 0,340 mL de Etanol 100% e foi misturado em vortex. Logo em seguida, foi adicionado o “lisado” na coluna “mini spin”, com um tubo por baixo e centrifugar por 1 min a 20.000 Xg. Descartado o filtrado e adicionado a cada coluna 0,5 mL do tampão AW1. Centrifugado por 1 min a 20.000 Xg Descartado o filtrado, secar o tubo e usar esse apoio novamente nas lavagens (1ª. lavagem). Adicionado 0,5 mL de Tampão AW2, e centrifugado por 3 min a 20.000 Xg. Foi descartado o filtrado (2ª. lavagem). Sendo colocada a “coluna” em um novo tubo previamente numerado e adicionado 0,25 mL de tampão AE, incubado por 1 min em temperatura ambiente. Centrifugado novamente por mais 2 min a 20.000 Xg, com o mesmo tubo. O filtrado, contendo o DNA extraído, foi armazenado no freezer -20°C.

As amostras que participaram do método 1 foram: 94 amostras que estão citadas no quadro 3.

Quadro 3. Números das amostras que participaram do método de extração 1

46	44	55	63	94	117	118	114	7	38
42	13	10	17	18	24	34	35	39	41
43	50	52	54	56	59	57	58	61	62
60	86	14	4	5	6	3	12	11	25
15	16	47	51	1	2	20	27	26	45
53	124	131	121	132	126	128	129	125	130
127	122	123	139	138	140	137	134	133	135
136	72	71	66	78	79	103	102	104	95
96	113	116	70	69	68	67	74	101	8
9	32	48							

5.4.2 PROTOCOLO GENECLEAN KIT ADAPTADO (MÉTODO 2)

A primeira etapa utilizando este método utilizamos os reagentes do primeiro kit descrito no item 5.4.1, e utilizamos esse outro kit comercial na etapa de purificação do DNA. Desta forma, inicialmente foi realizada a etapa de lise celular, com 0,5 mL da amostra e adicionado 1,4 mL do Tampão ASL e misturado em Vórtex por 1 min. As suspensões foram aquecidas em banho-maria à 95°C por 5 min. No final foi feita nova mistura em Vortex por 15 seg. Os tubos foram centrifugados por 1 min a 20.000 Xg.

O volume de 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e adicionado o volume de 1 mL da solução de iodeto de sódio (NaI), que foi a primeira solução do kit GeneClen II (cat no. 1001-400). A solução de Glass Milk reconstituída foi ressuspenso e aliqüotada em 0,2 mL dessa solução junto a amostra com NaI, foi misturado vortexado por 1 minuto. Incubar em temperatura ambiente por 5 min, misturando a cada 1 min para fazer a ligação do DNA na sílica. Ao final o tubo foi centrifugado por 1 min a 20.000 Xg e descartado o sobrenadante. Foi adicionado 0,5 mL da solução New Wash e ressuspenso o precipitado. Foi centrifugado nas mesmas condições anteriores por 1 min. O precipitado foi colocado em fluxo laminar para secar até evaporar o etanol residual. Ao final foi adicionado 0,2 mL de água ultrapura e ressuspenso o precipitado para eluir o DNA dessa matriz, e foi centrifugado por 3 seg e transferido todo o sobrenadante para um novo tubo.

5.5 CLASSIFICAÇÕES DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS

As amostras ambientais foram classificadas de acordo com o padrão de positividade ou negatividade apresentado nos resultados das análises por metodologia tradicional. Foram atribuídos escores de classificação, sendo considerado POSITIVAS e NEGATIVAS, com níveis de escores para classificação e separação das amostras que seguiriam para o método 1 e 2.

POSITIVAS – em três níveis de escores:

- (1) se foi identificado o alvo que seria analisado por microscopia, possuía altos níveis de resultados colimétricos e ainda tinha dado positividade no método de ELISA – recebeu o **maior escore**;
- (2) se não tinha sido identificado o alvo na microscopia, mas tinha sido observado ovos, cistos ou larvas; possuía altos níveis de resultados colimétricos e ainda tinha dado positividade no método de ELISA – recebeu **escore intermediário**;
- (3) se não tinha sido identificado o alvo na microscopia, mas tinha sido observado ovos, cistos ou larvas; possuía altos níveis de resultados colimétricos, mas sem dado positividade no método de ELISA – recebeu **escore mais baixo**;

NEGATIVAS – em dois níveis de escores:

- (4) não foi identificado o alvo, nem ovos, cistos e larvas, nem deu resultado no método de ELISA, mas possuía altos níveis de resultados colimétricos – recebeu o **maior escore**;
- (5) não foi identificado o alvo, nem ovos, cistos e larvas, nem deu resultado no método de ELISA, possuía baixos níveis de resultados colimétricos – recebeu o **menor escore**

5.6 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS (PRIMERS)

5.6.1 PARA AMPLIFICAÇÃO DE PORÇÃO DO GENE MITOCONDRIAL DE *Ascaris sp.*

O desenho dos iniciadores para *Ascaris sp.* foi baseado no trabalho de Liu, G.H., et al (2012), genoma completo mitocondrial, que tem por número de acesso no GenBank - HQ704900.1, para as sequências de (AS-F1), (AS-F2), *A.lumbricoides*.

O iniciador (AS-F1) hibridiza com a fita Crick (3'-5') na posição 10884-10910, enquanto o iniciador (AS-R1) hibridiza com a fita Watson (5'-3') na posição 11128-11148.

As sequências dos iniciadores foram estão listadas no quadro 4:

Forward primer (AS-F1): 5'GTAAAAGGGTTGTAGTATAGAGAG 3'

Reverse primer (AS-R1): 5'CTCAAAAAGGCCAAAGCACC 3'.

Quadro 4. Sequência esperada do amplicon para *Ascaris* sp. e tamanho esperado.

PAR DE OLIGO	SEQUENCIA ESPERADA	TAMANHO ESPERADO DO AMPLICON (nt)
AS-F1 AS-R1	<u>gtaaaagggtttagtatagagag</u> agggagaggttactctgttagttatgttttaa aatatgactttgaagaagtgggaatgtaggagtgattaagttggatttgtaattc tatggtttaggttaccgtctagtaagggtttaacttatggttgaattttgtagtatgt tgggtatggtttgggtttcagattttgactggtactttttgctttttatttctaagat <u>ggtgctttggccttttgag</u>	264

5.6.2- PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE BETA-GIARDIN DE *Giardia* sp.

Os iniciadores para *Giardia* sp. foram os desenvolvidos no trabalho de Cacciò et. al. (2002), para o gene beta-giardin, que tem por número de acesso no GenBank AY072723.1

O iniciador (G7F) hibridiza com a fita Crick (3'-5') na posição 1-26, enquanto o iniciador (G759R) hibridiza com a fita Watson (5'-3') na posição 726-753.

As sequências dos iniciadores estão listadas no quadro 5:

Forward primer (G7F): 5' AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC 3'

Reverse primer (G759R): 5' GAGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC 3'.

Quadro 5. Sequência esperada do amplicon para *Giardia* sp. e tamanho esperado.

PAR DE OLIGO	SEQUENCIA ESPERADA	TAMANHO ESPERADO DO AMPLICON (nt)
G7F/G759R	<u>aa gcccga cga cctcaccg cagtg c</u> gaccg agacggcggc aagctcagcaacatgaacca gcg cgtcagcaggttcca cga caagatggag aacgag atcgaggccgcgcgctgacgacga cacgcgcgt gaagatgatcaaggacgccatcgcacacctcgacaggtctatccagacggagtc gag gaagcgc caggcctcgtt cgaggacatcgcg gaggaggtc aagaagtcc gccgacaacat gtacctaacg atc aaggag gagatcgacacc atggctgcaaacttcgc aagtccttgcggag a tgggcgacacactcaacaacggtgag acaaatctcagaacagatcgccatc cataacgacgcc atcgcg gctctcaggaaggag gccctcaagagcctgaacg atctcgagacggcattgcccacg gag aacgcagaaagg aag aag atgtacgacc agctcaacgagaaggtcgcagagggtctgc ccgcatctccgcgcg atc gag aag gagacga tgc cccgcg agaggccgttagtgc tccac gacagaagcgt cacaaacacgaagctcgtcgagaagtcgtcaacgagcagctcgagaacgt cgctcggagatcgcgctatccaggaggag atcgaccgcgagaaggccgagcg caaggagg cagaggacaagatcgtcaactctcgaggac <u>gtcgtctcgaaga tcca ggcggcctc</u>	753

5.6.3 ESPECIFICIDADE DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

Embora os pares de oligonucleotídeos (*primers*) tenham sido desenhados especificamente para identificação das espécies alvo, as amostras ambientais pode ter composição complexa, e o organismos alvo não se encontra isolado e nem em grande quantidade como ocorre com amostras clínicas de fezes, então foi realizado uma avaliação sobre a especificidade teórica dos *primers*, que foi realizada pelo programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”), descritos por Altschul, em 1990 (Zaha et al., 2014). Neste foi possível analisar a especificidade dos *primers* em relação ao alvo desejado. Para isso foram realizados alinhamentos com as sequências depositadas no banco de dados próprio do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), conhecido como GenBank. Esta análise foi realizada para saber se os *primers* desenhados para cada parasito poderiam anelar com outros organismos avaliados no presente estudo. Foram avaliados pelo percentual de identidade que cada organismo que aparecia, e consideradas somente os que tinham dados 100% de identidade após rodar no BLASTn, sem escolher o tipo de organismo.

5.7 CONDIÇÕES DA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

5.7.1 CONCENTRAÇÕES DOS REAGENTES NA PCR

A reação de amplificação por PCR foi realizada em termociclador do tipo gradiente, modelo Veriti 96-well (Life Technologies do Brasil, Ltda., São Paulo, SP), em volume final de 10 μ L, contendo as concentrações finais de 0,125 U da enzima Taq Polimerase (5U/ μ L) [DNA Express Biotecnologia, no. 230412]; 1X de tampão de PCR (DNA Express Biotecnologia); 2 mM de desoxinucleotídeos - dNTPs (DNA Express Biotecnologia), 3 mM de cloreto de magnésio (DNA Express Biotecnologia) e 5 μ M de cada iniciador (primer), 4 μ L da amostra extraída de DNA. Para diminuir o erro nas condições de pipetagem foi realizado uma mistura (*mix*) dos reagentes, exceto a Taq Polimerase e do DNA a ser amplificado.

5.7.2 CICLAGEM DO TERMOCICLADOR PARA PCR

5.7.2.1 CICLAGEM PARA O ALVO *Ascaris e Giardia sp.*

As condições de ciclagem para amplificação do alvo de *Ascaris* tiveram quatro etapas: a primeira era constituída de uma incubação inicial a 92°C por 2 min para desnaturação das amostras; a segunda de 10 ciclos constituídos por: etapa de desnaturação a 92°C/10seg, etapa de associação a 59°C/30seg e extensão da 60°C/8 min; a terceira de 25 ciclos constituídos por: etapa de desnaturação a 92°C/10seg, etapa de associação a 59°C/30seg e extensão da 60°C/8min (acrescendo 10 seg em cada ciclo), como mostra no quadro 5. E após o último ciclo, foi feita a quarta etapa que era uma última incubação por 10 min à 60°C, seguida de resfriamento a 4°C. Após o término da amplificação, o produto desta PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%. As condições de termociclagem utilizadas no presente trabalho estão explicitadas no quadro 6.

Quadro 6. Condições de termociclagem da PCR utilizando os oligonucleotídeos para ambos os parasitos

Ciclos	Temperatura °C	Tempo	Repetições
Desnaturação inicial	92°C	2min	1x
Desnaturação	92°C	10 seg	10x
Anelamento	59°C	30 seg	
Extensão	60°C	8 min	
Desnaturação	92°C	10 seg	25x
Anelamento	59°C	30 seg	
Extensão	60°C	8 min*	
Extensãofinal	72°C	10 min	1x
	4°C	∞	-

* Acrescenta-se 10 seg a mais a cada ciclo nessa etapa.

5.7.3 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

Os produtos da PCR (amplicons) foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose de 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-HCl 0,45 mM; ácido bórico 0,45 mM; EDTA 2,5 mM) - TBE, juntamente com o corante brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Foi utilizado um padrão de peso molecular de 100 pares de base (DNA Express Biotecnologia, cat no.300512). Em 10µL do produto da PCR foram adicionados 2 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%; xilenocianol FF 0,25% e glicerol 50%), e a separação eletroforética foi realizada a 100V, 60 mA, durante 1h e 20 minutos. Após a corrida eletroforética, o gel foi observado no transiluminador (Dual intensity transiluminador, modelo UVP) e registrado com fotografia digitalizada.

5.8- REAMPLIFICAÇÃO DE BANDA

Neste trabalho foi utilizada a estratégia de reamplificação de banda por PCR (Lima et al, 2007), somente para os resultados que na PCR direta apresentaram-se como negativos em gel de agarose. Para isso as regiões correspondentes à banda esperada foram excisadas do gel, colocadas em 0,4 mL de água ultrapura e deixadas em temperatura ambiente por 18 horas. Ao final, uma alíquota de 5 µL desta amostra foi submetida a amplificação por PCR como anteriormente descrita. E foram analisadas novamente em gel de agarose.

6 RESULTADOS

6.1 SEQUÊNCIAS POSSÍVEIS DE AMPLIFICAÇÃO A PARTIR DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS

Embora os iniciadores tenham sido desenhados para sequências alvo dos principais parasitos que poderiam estar nas amostras ambientais, durante a extração de DNA neste tipo de amostra complexa, pode ser encontrado DNA de outros organismos, como o DNA humano, de vegetais, de bactérias, de fungos e de outros parasitos não alvo. Portanto, na técnica empregada para isolar os parasitos pode ter sido isolado junto com o DNA dos organismos alvo, outras amostras indesejáveis.

Por isso buscou-se no GenBank analisar a identidade das sequências dos iniciadores para as sequências alvo dos parasitos investigados nesse estudo, portanto foi feita a busca de similaridade no banco de dados, com o BLASTn, e foram encontrados para os iniciadores de *Ascaris sp* com 100% de identidade somente organismos do gênero *Ascaris*, contudo com menor identidade são encontrados outros organismos (Quadro 7) e para os iniciadores de *Giardia sp*. foram encontrados outros organismos (Quadro 8).

6.1.1 COM INICIADORES DESENHADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Ascaris sp*.

Figura 9. Quadro demonstrativo da busca de similaridade no banco de dados do GenBank, no BLASTn, para a sequência de 24 nucleotídeos do iniciador de *Ascaris sp*., AS-F1, realizada em julho/2016.

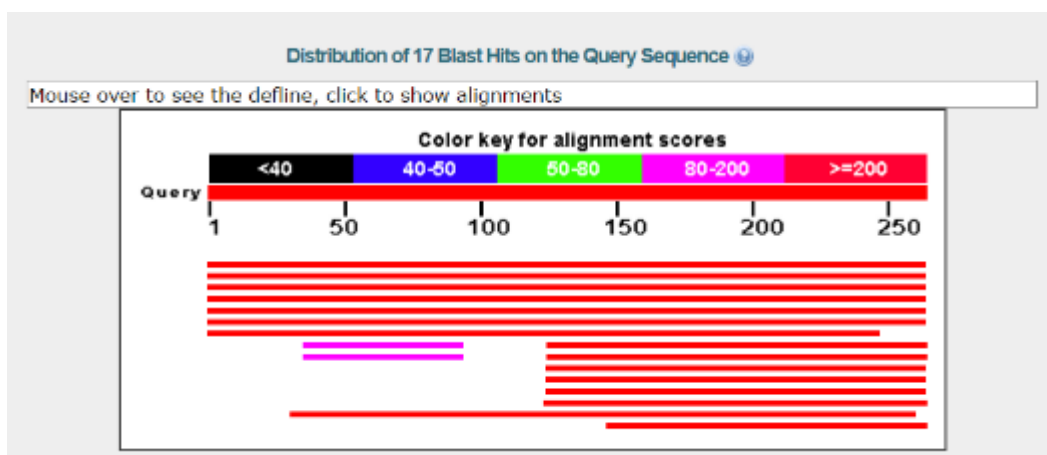


Figura 10. Sequências produzindo alinhamentos significativos no BLASTn para o iniciador de *Ascaris sp.* (AS-F1)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Ascaris suum mitochondrion, complete genome	488	488	100%	2e-134	100%	HQ704901.1
<input type="checkbox"/> Ascaris lumbricoides mitochondrion, complete genome	488	488	100%	2e-134	100%	HQ704900.1
<input type="checkbox"/> Ascaris lumbricoides isolate 389 clone 02 cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	259	259	53%	2e-65	100%	EF439710.1
<input type="checkbox"/> Ascaris lumbricoides isolate DL13 cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	219	219	44%	3e-53	100%	EF150651.1
<input type="checkbox"/> Ascaris suum mitochondrial tRNA-Phe	110	110	22%	2e-20	100%	D28745.1
<input type="checkbox"/> A suum mitochondrial Phe-tRNA	110	110	22%	2e-20	100%	M19856.1
<input type="checkbox"/> Ascaris suum complete mitochondrial genome	483	483	100%	1e-132	99%	X54253.1
<input type="checkbox"/> Ascaris lumbricoides isolate 389 clone 01 cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	254	254	53%	9e-64	99%	EF439709.1

Além do *Ascaris lumbricoides*, outros parasitos encontrados com percentual elevado de identidade para a sequência alvo apresentada na busca com 264 nt foram: *Ascaris suum*, 100% de identidade e *Toxascaris leonina* com 85% de identidade.

A identidade com sequência do *Forward primer* (AS-F1) 5'GTAAAAGGGTTGTAGTATAGAGAG3' também apresentou percentual elevado na busca no BLASTn com outros organismos, tais como: apresentado no quadro 7.

Quadro 7. A identidade com sequência do iniciador do (AS-F1) encontrado no BLASTn

Sequencia alvo	Parasito alvo	Outros organismos encontrados	Percentual de Identidade (%)
<i>Forward primer</i> (AS-F1) 5'GTAAAAGGGTTGTAGTATAGAGAG 3'	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Ascaris suum</i>; • <i>Limulus polyphemus</i>; • <i>Apteryx australis</i>; • <i>Protopolystoma xenopodis</i> • <i>Chryseobacterium sp.</i>; • <i>Formosa agariphila</i>; • <i>Daucus carota</i>; • <i>Petaurista elegans</i>; • <i>Polistes dominula cholinesterase</i>; • <i>Vigna radiata var. radiata</i>; • <i>Trichoderma atroviride</i>; • <i>Apteryx australis</i>; • <i>Cucumis melo</i>; • <i>Hymenolepis diminuta</i>; • <i>Strongylus vulgaris</i>; • <i>Schistosoma rodhaini</i>; 	100

		<ul style="list-style-type: none"> • <i>Gongylonema pulchrum</i>; • <i>Diphyllobothrium latum</i>; • <i>Trichobilharzia regenti</i>; • <i>Dicrocoelium dendriticum</i>; • <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>; • <i>Borrelia anserina</i>; • <i>Fusarium fujikuroi</i>; • <i>Enterobacter cloacae</i>; • <i>Flavobacterium indicum</i>; • <i>Schistosoma mansoni</i>; • <i>Sulfurihydrogenibium azorense</i>; • <i>Aspergillus ochraceoroseus</i>; • <i>Feldmannia species vírus</i>; • <i>Mus musculus</i>; • <i>Homo sapiens</i>; • <i>Vigna angularis</i>. • <i>Macaca fascicularis</i>. 	
--	--	--	--

A identidade com sequência do *Reverse primer* (AS-R1) também apresentou percentual elevado na busca no BLASTn com outros organismos, tais como: apresentado no Quadro 8.

Quadro 8. A identidade com sequência do iniciador do (AS-R1) encontrado no BLASTn

Sequencia alvo	Parasito alvo	Outros organismos encontrados	Percentual de identidade (%)
<i>Reverse primer</i> (AS-R1) 5'CTCAAAAAGGCCA AAGCACC 3'.	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Ascaris suum</i> • <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. 	100

6.1.2 COM INICIADORES DESENHADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Giardia sp.*

Figura 11. Quadro demonstrativo da busca de similaridade no banco de dados do GenBank, no BLASTn, para a sequência de 26 nucleotídeos do iniciador de *Giardia sp.* (G7F), realizada em julho/2016.

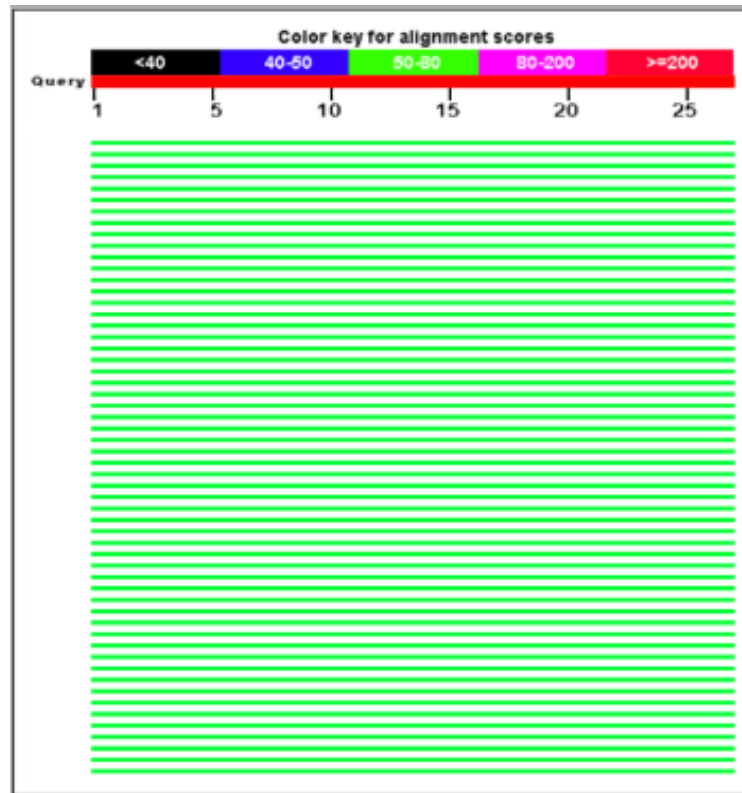


Figura 12. Sequências produzindo alinhamentos significativos no BLASTn para o iniciador de *Giardia sp.* (G7F)

<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis isolate AB beta-giardin gene, complete cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	EU014381.1
<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis isolate 57H beta-giardin gene, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	DQ466788.1
<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis isolate 01H beta-giardin gene, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	DQ466732.1
<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis isolate 34H beta-giardin gene, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	DQ466765.1
<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis strain LD 18 beta giardin mRNA, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	AY072726.1
<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis strain P15 beta giardin mRNA, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	AY072729.1
<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis strain ISSGF7 beta giardin mRNA, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	AY072724.1
<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis strain BAH8 beta giardin mRNA, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	AY072727.1
<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis strain Ni5 beta giardin mRNA, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	AY072725.1
<input checked="" type="checkbox"/> Giardia intestinalis strain KC8 beta giardin mRNA, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	AY072723.1
<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis isolate CBHRG22 beta-giardin gene, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	DQ116622.1
<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis isolate CBHRG21 beta-giardin gene, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	DQ116621.1
<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis isolate CBHRG19 beta-giardin gene, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	DQ116620.1
<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis isolate A101 beta-giardin gene, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	AY647264.1
<input type="checkbox"/> Giardia intestinalis isolate A21 beta-giardin gene, partial cds	54.0	54.0	100%	5e-05	100%	AY545647.1

A identidade com sequência do *Forward primer* (G7F) também apresentou percentual elevado na busca no BLASTn com outros organismos, como pode ser visto representado no

Quadro 9. A identidade com sequência do iniciador do (G7F) encontrado no BLAST

Sequencia alvo	Parasito alvo	Outros organismos encontrados	Percentual de identidade (%)
<i>Forward primer</i> (G7F) 5'aagcccgacgacctcaccgcagtg3'	<i>Giardia intestinalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Rhodotorula toruloides</i> • <i>Amycolatopsis orientalis</i> • <i>Bradyrhizobium sp.</i> • <i>Methylobacterium extorquens</i> • <i>Gekko japonicus</i> • <i>Chondromyces crocatus</i> • <i>Halorubrum trapanicum</i> • <i>Streptomyces sp</i> • <i>Roseateles depolymerans</i> • <i>Saccharothrix espanaensis</i> • <i>Burkholderia latens</i> • <i>Micromonospora purpureochromogenes</i> • <i>Phoenix dactylifera</i> • <i>Streptomyces clavuligerus</i> • <i>Azoarcus olearius</i> • <i>Halopenitus persicus</i> • <i>Rhodococcus fascians</i> • <i>Streptomyces albus</i> • <i>Paucibacter sp</i> • <i>Microbacterium sp.</i> • <i>Alloactinosynnema sp.</i> • <i>Altererythrobacter marensis</i> • <i>Herbaspirillum seropedicae</i> • <i>Micromonospora krabiensis</i> • <i>Methylobacterium populi</i> 	100

6.2 REPRESENTATIVIDADE DOS RESULTADOS PARASITOLÓGICOS DAS AMOSTRAS POR MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO POR MICROSCOPIA E ELISA

O conjunto de amostras que participaram deste estudo foi composto para apresentar resultados por métodos anteriormente utilizados na identificação de amostras ambientais, deste conjunto de 129 amostras, 35% com resultados positivos para nematoides no método com identificação por microscopia. 85% com resultados positivos para protozoários no método com identificação por método imunológico ELISA.

As amostras identificadas como positivas por microscopia apresentaram 9,3 % (12) positiva para o alvo *Ascaris sp.* E para ELISA somente dois protozoários foram diagnosticados, portanto as 85% amostras que deram resultados positivos para os ensaios utilizados que foram para *G. lamblia*, *E. histolytica/díspar*, *Cryptosporidium sp.* (kit IVD Research ®), contudo somente em 8,5% (11) somente algumas apresentaram resultado positivo para *Giardia sp.*

Dentro desse conjunto de amostras positivas por identificação na microscopia, em 29,5% não foram identificados os dois parasitos alvos testados neste estudo, contudo foram encontradas formas de larvas, 11% (14) rabditoides e 22,5% (29) filarioides. Portanto a técnica de identificação por microscopia permite avaliar a presença ou ausência de elementos de riscos parasitológicos. Além desses resultados positivos ocorreram em 89% quando os resultados das análises dos níveis colimétricos estavam acima dos limites estabelecidos como próprios pela resolução SMAC 468/2010.

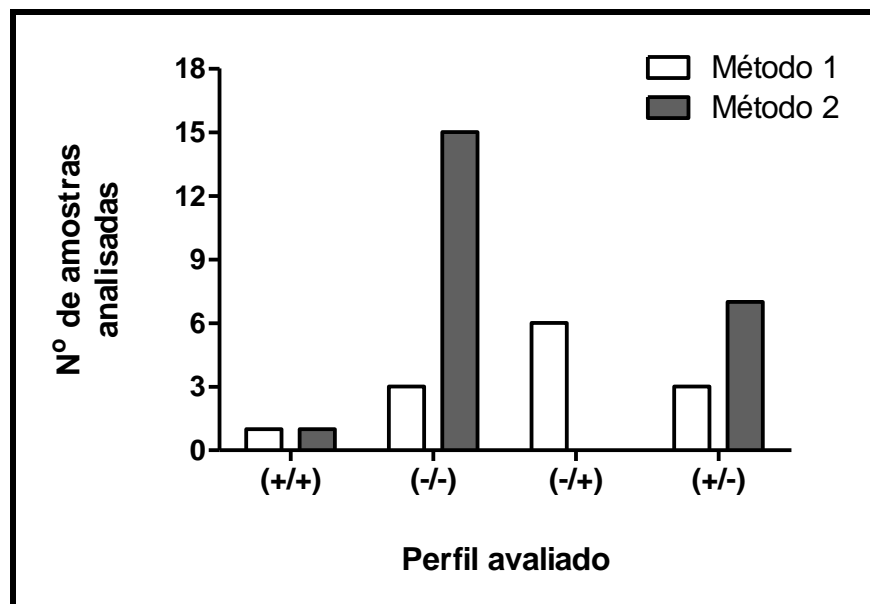
Quadro com os valores dos níveis colimétricos e dos resultados para cada amostra encontram-se nos Apêndice I e Apêndice II.

6.3 ANÁLISE POR BIOLOGIA MOLECULAR COM INICIADORES PARA *Ascaris sp.*

6.3.1 DIFERENCIADO PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA

Com um intuito de delinear um perfil entre as diferentes extrações de DNA utilizadas, determinou-se nesse estudo uma comparação direta entre os diferentes métodos testados, 1 e 2. Os resultados apresentados apontam para o perfil esperado, isto é, negativo para microscopia e positivo para biologia molecular (-/+); que o método 1 mostrou-se mais sensível para esta análise permitindo obter maior número de amostras amplificadas (figura 13)

Figura 13. Comparação das amostras extraídas por ambos os métodos (1 e 2) para *Ascaris* sp. (+/+) = Amostras positivas para microscopia e biologia molecular; (-/-) = Amostras negativas para microscopia e biologia molecular; (-/+) = Padrão esperado, negativo para microscopia e positivo para biologia molecular; (+/-) = Padrão não esperado, positivo para microscopia e negativo para biologia molecular.



6.3.2 DIRETO SEM DIFERENCIAR O MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA

Conforme descrito na seção 5.4 de material e métodos, foram utilizados dois métodos de extração de DNA das amostras ambientais, e os resultados descritos abaixo nesta seção não irão fazer distinção entre eles.

Em termos percentuais de representatividade, 91,4% (128/140) de amostras identificadas como negativas para *Ascaris* sp. pelos métodos tradicionais, 52,3% (67/128) apresentaram resultado positivo por biologia molecular. Dentre as amostras positivas para *Ascaris* sp. na microscopia, 58,3% (7/12) foram identificadas como positivas na biologia molecular. Outras espécies de nematoides que também foram consideradas positivas na microscopia, sendo que dentre elas 66,6% (22/33) foram positivas também pelo método de biologia molecular para *Ascaris* sp.

Das 140 amostras ambientais analisadas, 52,14% (73) apresentaram resultados de amplificação esperada, como positiva para *Ascaris sp* de forma direta, ou seja, apresentaram visualização da banda de 264 pares em gel de agarose na primeira amplificação. As que foram identificadas como positivas diretamente pela técnica de biologia molecular proposta neste estudo foram: 7, 38, 94, 117, 114 (Figura 14); 10; 17; 18; 24; 39; 41; 43; 52 (Figura 15); 54; 59; 57; 58; 61; 60; 86; 6, 13 (Figura 16); 12; 11; 15; 51; 1; 2; 27; 26, 45 (Figura 17); 53; 131;121;132; 128, 125; 127; 122; 123 (Figura 18); 138; 140;137; 134; 133; 136 (Figura 19); 103; 95;113; 69; 67; 74; 101 (Figura 20); 8; 9; 32; 48 (Figura 21); 88; 7'; 111' (Figura 22); 33 e 30 (Figura 23); 89 (Figura 24); 92 (Figura 25). Sabe-se das limitações técnicas para visualização de uma banda por essa metodologia, que é menos sensível que a revelada através de um gel de poliacrilamida, contudo um dos objetivos desse trabalho foi verificar a possibilidade de identificação do alvo, por método de biologia molecular, que fosse mais barato e menos laboroso, de modo que as companhias de controle sanitário ambiental pudessem empregar esta técnica como rotina de análise de amostras ambientais.

Os resultados apresentados nas figuras 14 a 20 foram para amostras extraídas pelo método 1, em quanto que os das figuras 21a 24 foram para amostras extraídas pelo método 2.

Figura 14. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp*. Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 7; 38; 94; 117; 114. Sendo: PM – Marcador de Peso Molecular; CP - controle positivo para o alvo.

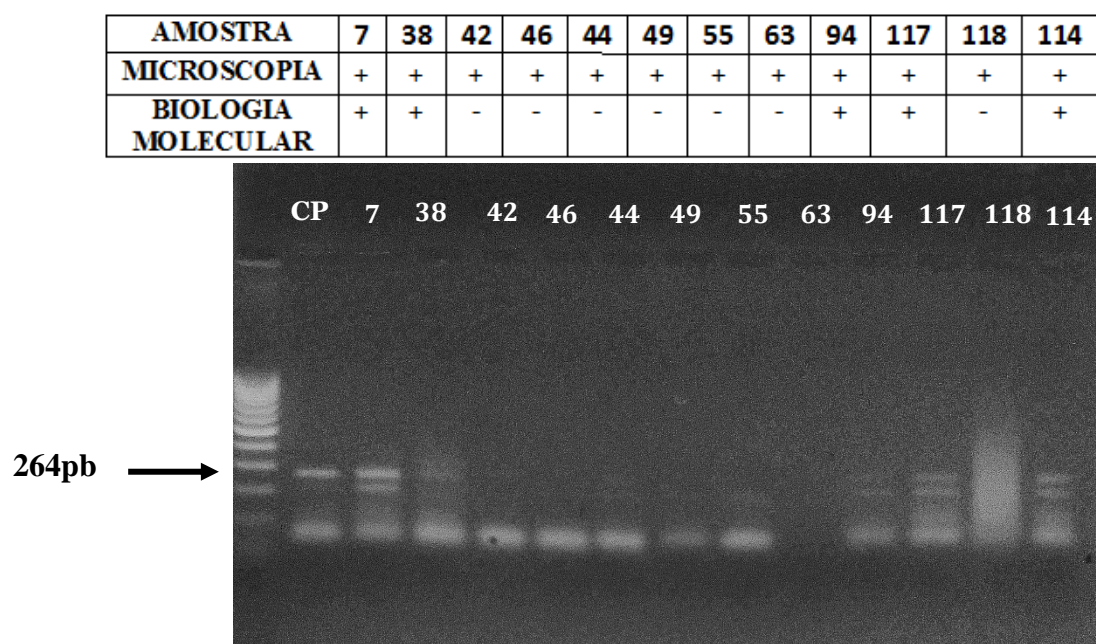


Figura 15. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 10; 17; 18; 24; 39; 41; 43; 52

AMOSTRA	13	10	17	18	24	34	35	14	39	41	43	50	52
MICROSCOPIA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BIOLOGIA MOLECULAR	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+

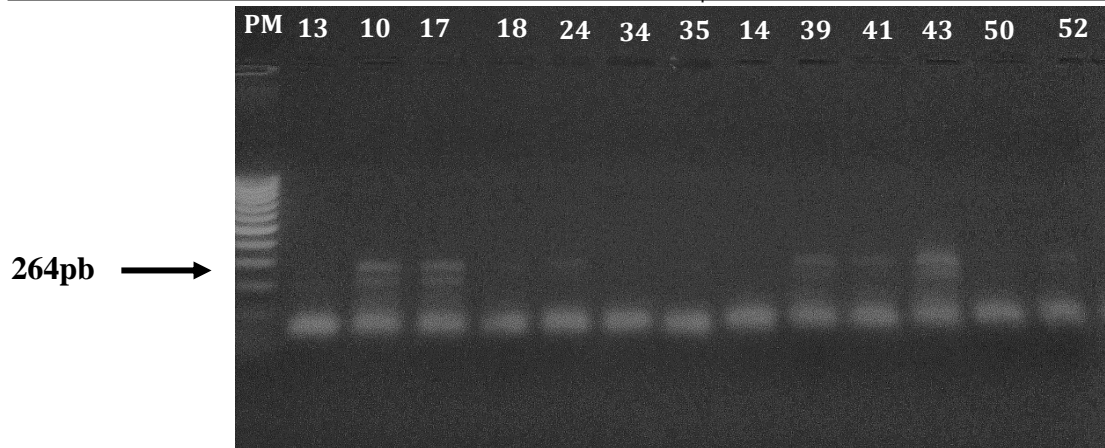


Figura 16. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 54; 59; 57; 58; 61; 60; 86; 6, 13.

AMOSTRA	54	56	59	57	58	61	62	60	86	4	5	6	13
MICROSCOPIA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BIOLOGIA MOLECULAR	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+

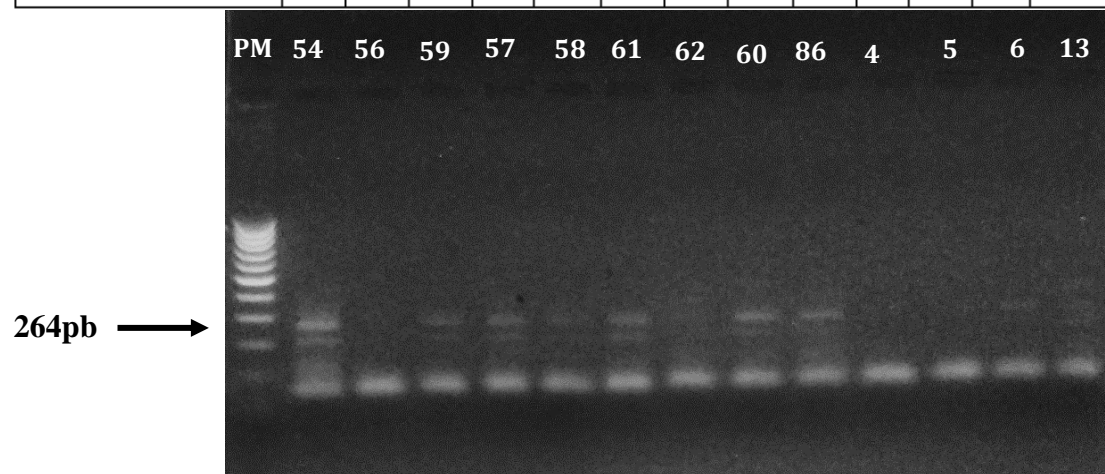


Figura 17. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 12; 11; 15; 51; 1; 2; 27; 26, 45.

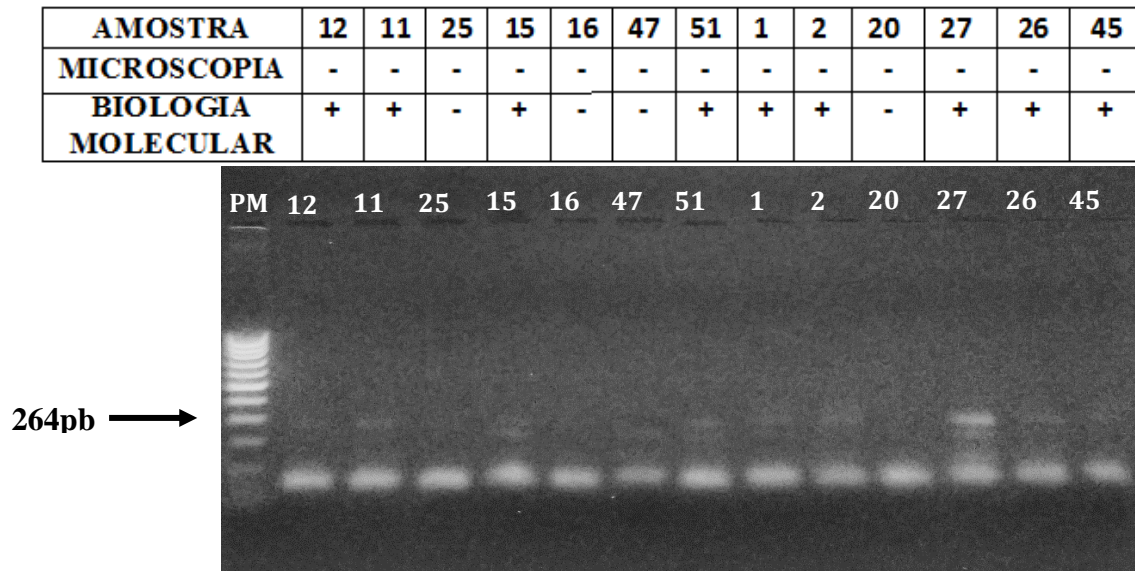


Figura 18. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 53; 131;121;132; 128, 125; 127; 122; 123.

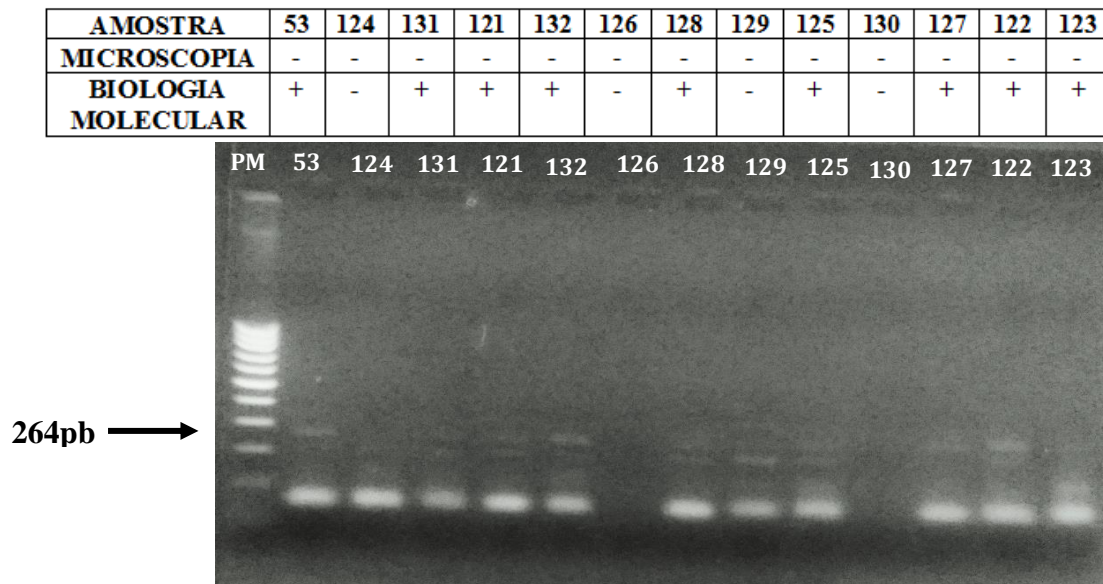


Figura 19. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 138; 140; 137; 134; 133; 136

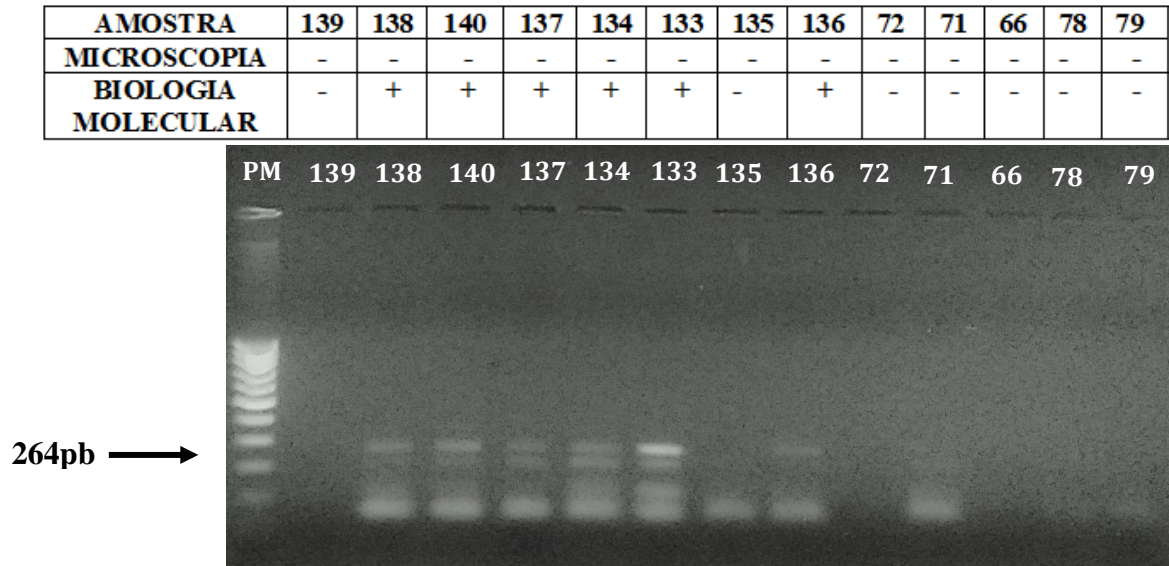


Figura 20. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 103; 95; 113; 69; 67; 74; 101.

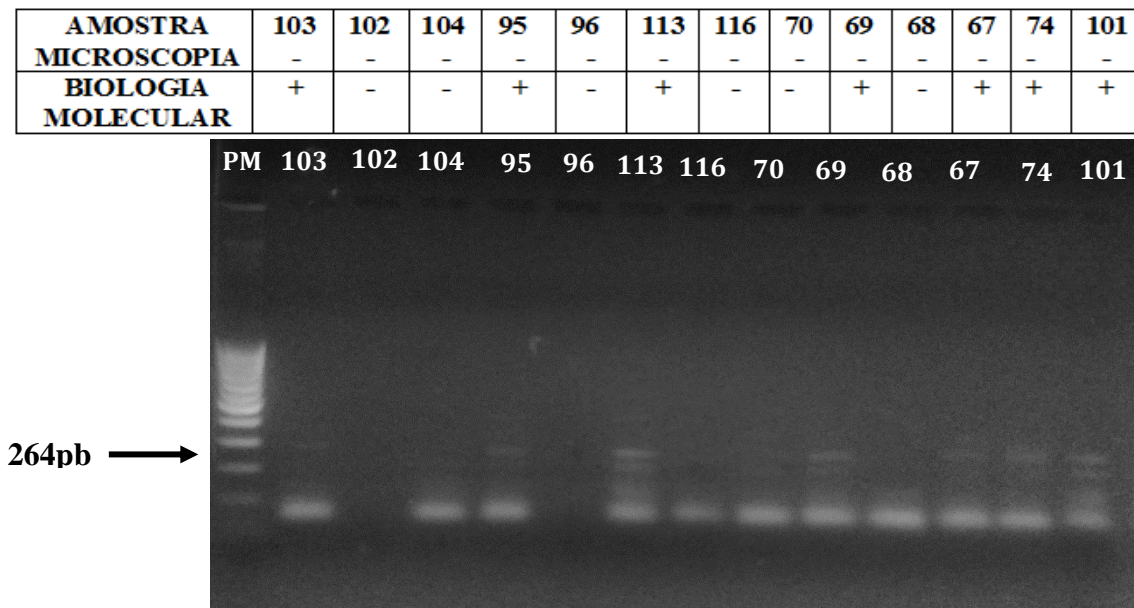


Figura 21. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 8; 9; 32; 48.

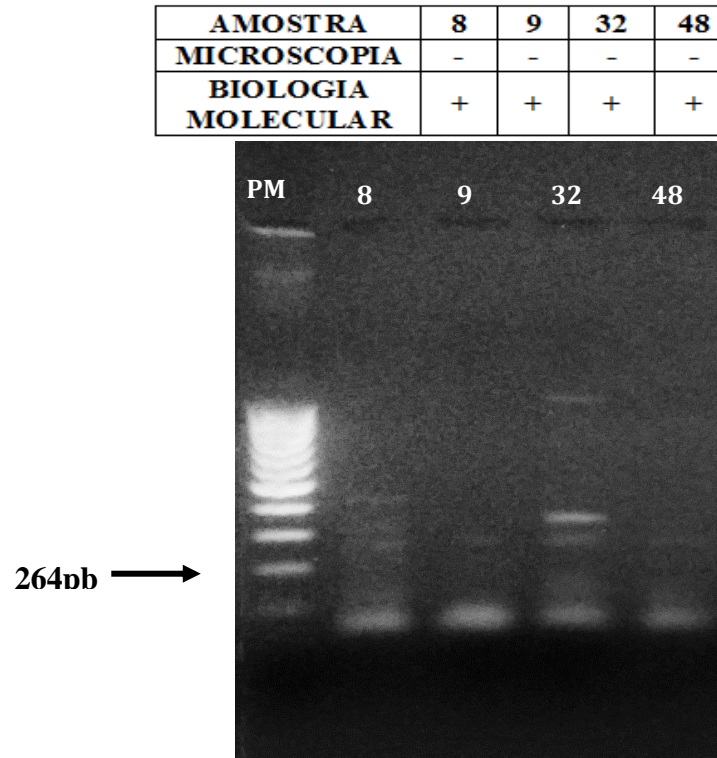


Figura 22. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 88; 7'; 111.

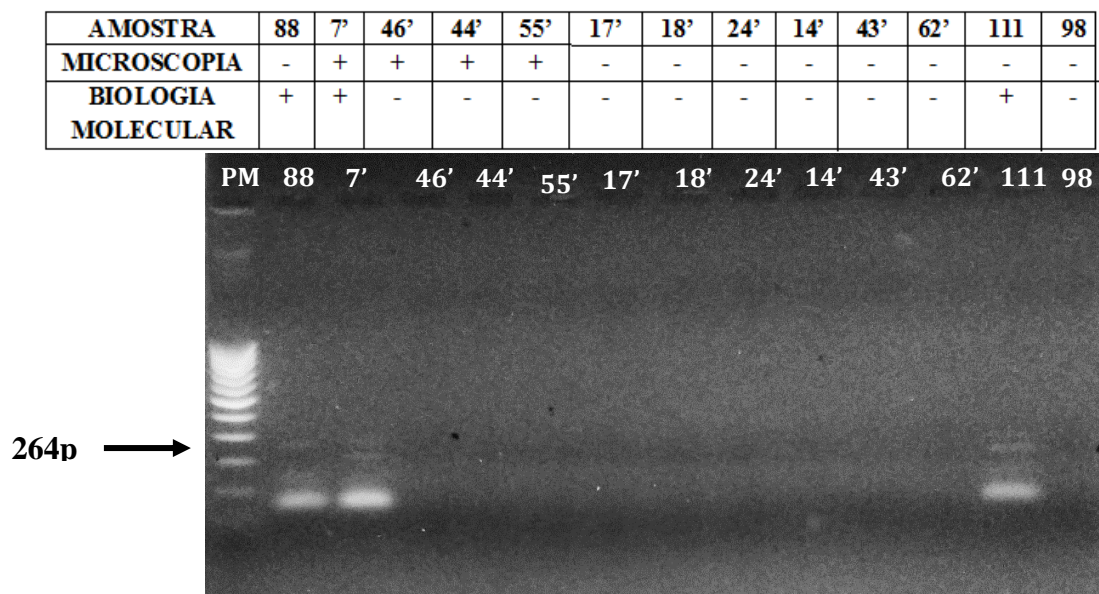


Figura 23. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 33 e 30.

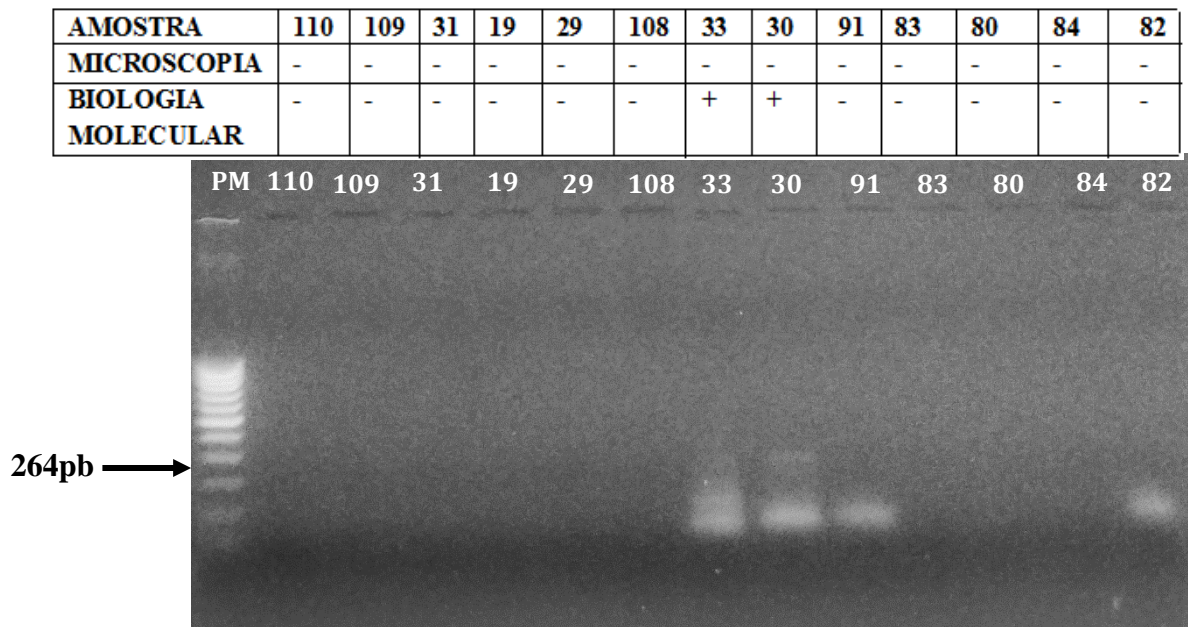


Figura 24. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base na amostra: 89.

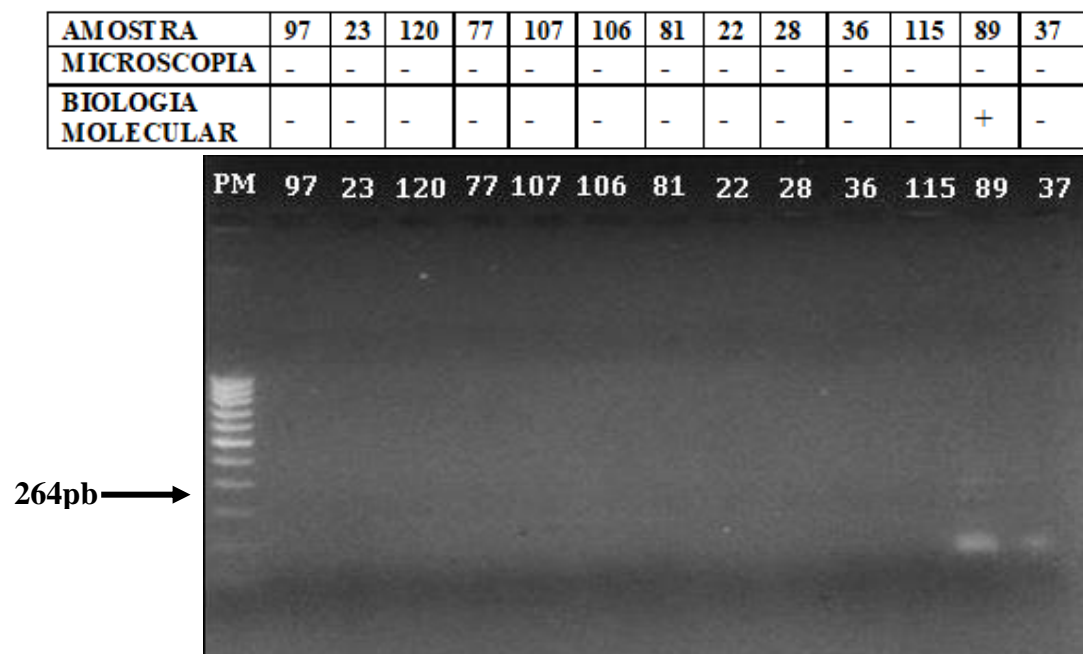


Figura 25. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base na amostra 92.

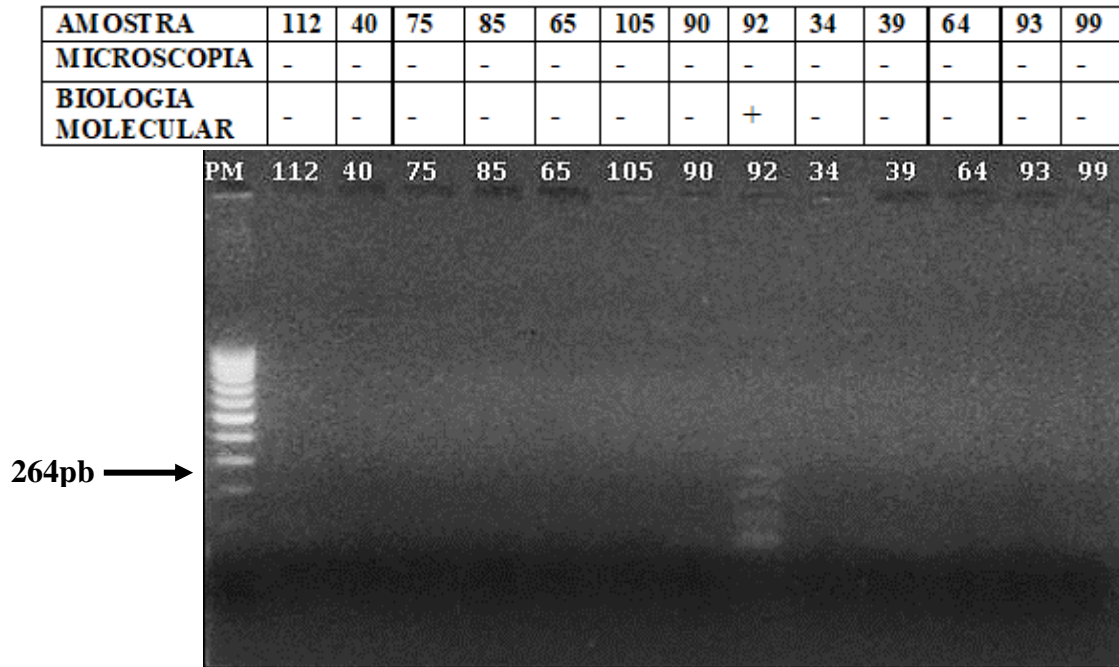
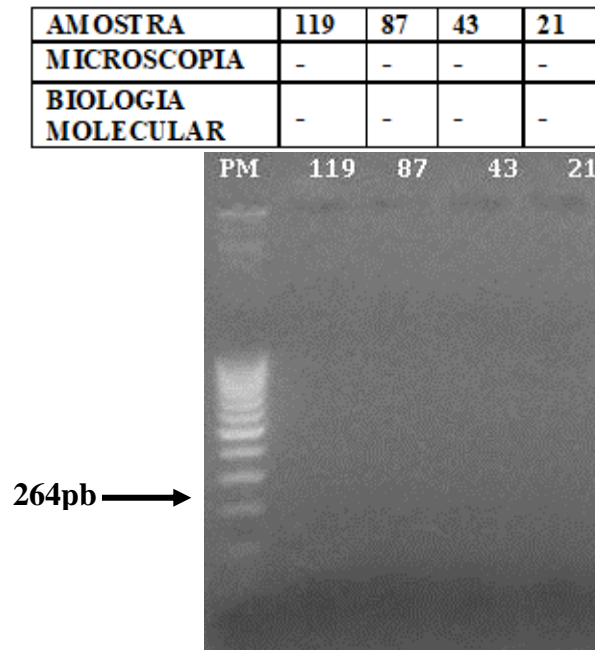


Figura 26. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp.* Não foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas

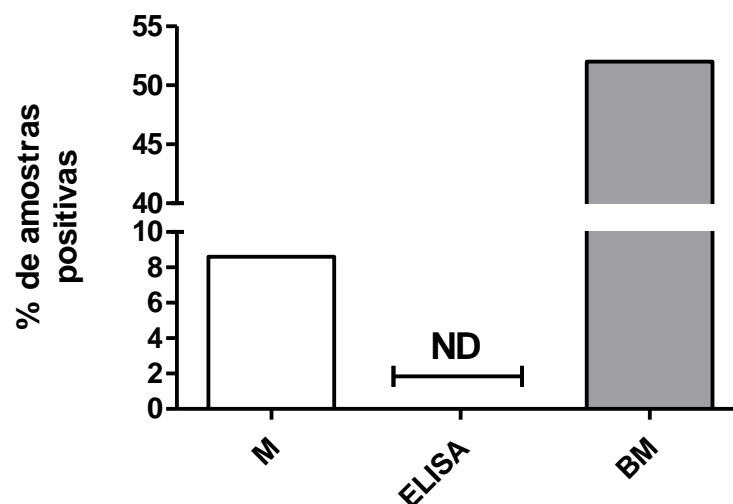


Figura 27. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo *Ascaris sp.* Não foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras.



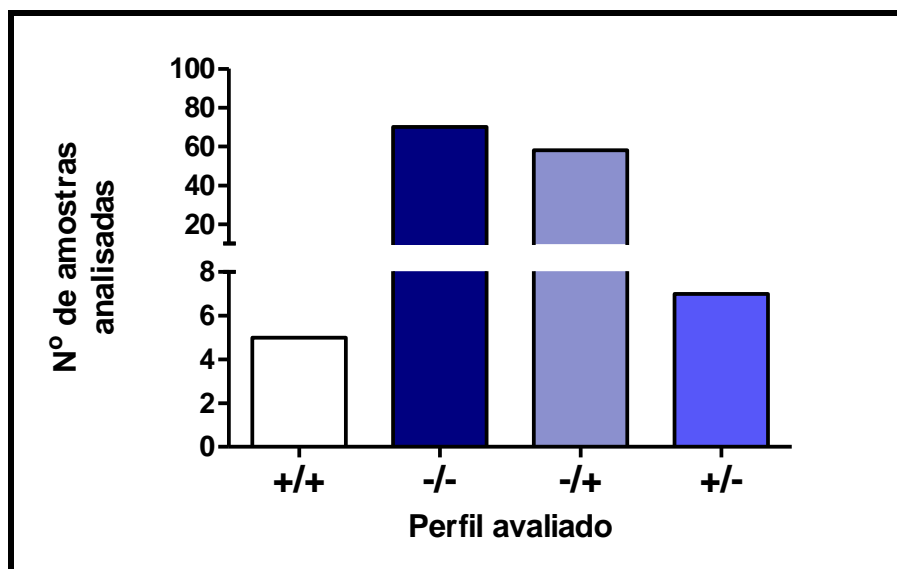
Ao estabelecer um estudo comparativo direto entre os diferentes métodos empregados no monitoramento ambiental, a saber, microscopia, ELISA e biologia molecular, foi demonstrada maior sensibilidade para a técnica de PCR, apresentando uma taxa de eficiência superior àquela reportada pelos métodos tradicionais (Figura 28).

Figura 28. Percentagem de amostras positivas diagnósticas em matrizes ambientais (areia) nos diferentes métodos testados para *Ascaris sp.* M= microscopia; ND= Não detectado; BM= Biologia Molecular.



Essa tendência foi também verificada quando analisamos os perfis das amostras em função aos diferentes métodos de diagnóstico testado. De acordo com o resultado apresentado para o perfil esperado, isto é, amostras negativas para a microscopia e positivas para biologia molecular (-/+), a técnica de amplificação por PCR mostrou-se novamente mais sensível em relação ao método tradicional, justificando seu uso em programas de monitoramento ambiental (figura 29).

Figura 29. Perfil das amostras ambientais avaliadas pelos diferentes métodos de diagnóstico testados. *Ascaris* sp: (+/+) = Amostras positivas para microscopia e biologia molecular; (-/-) = Amostras negativas para microscopia e biologia molecular; (-/+) = Padrão esperado, negativo para microscopia e positivo para biologia molecular; (+/-) = Padrão não esperado, positivo para microscopia e negativo para biologia molecular.



6.4 COM REAMPLIFICAÇÃO PARA O ALVO *Ascaris* sp.

Das 67 amostras de *Ascaris* sp que se apresentaram negativas pela PCR direta para o alvo *Ascaris* sp, foram selecionadas 30 amostras para a reamplificação. E em 13 (43,3%) foram visualizadas com sucesso o amplicon em gel de agarose na região da banda esperada, sendo elas: 57, 47; 124; 131 (Figura 30); 126; 128; 139; 135; 102 e 104 (Figura 31); 70; 116; 68 (Figura 32).

Figura 30. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise de reamplificação da banda para *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 57, 47; 124; 131.

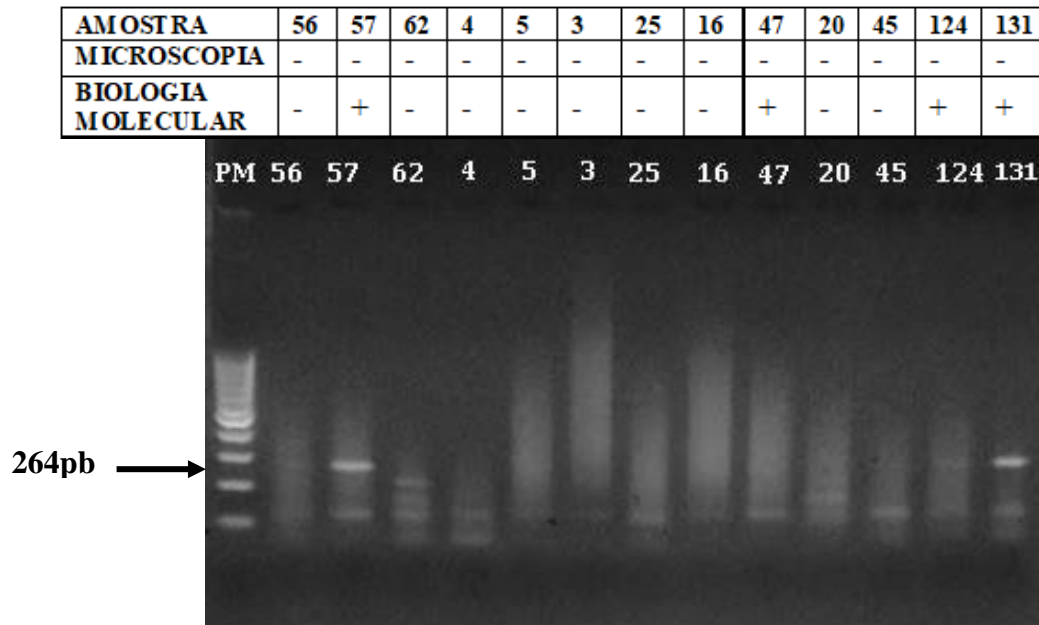


Figura 31. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise de reamplificação da banda para *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 126; 128; 139; 135; 102 e 104.

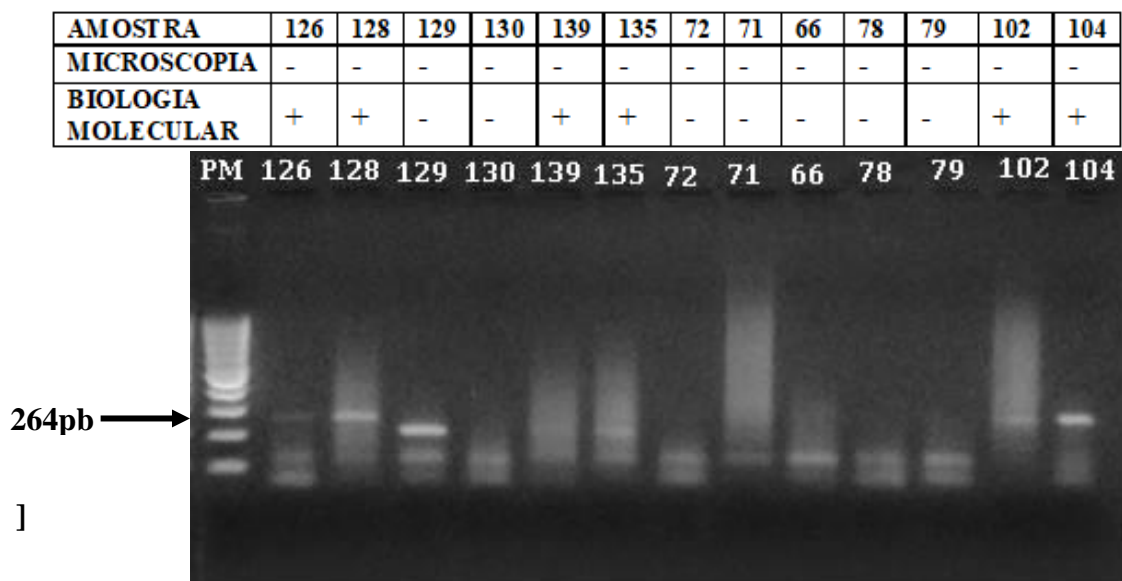
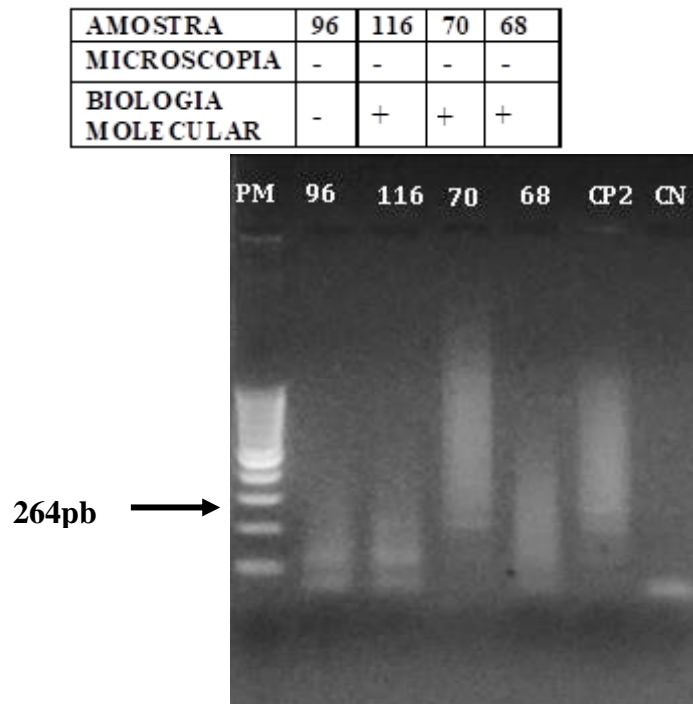


Figura 32. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise de reamplificação da banda para *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 264 pares de base nas amostras: 70; 116; 68. Sendo, PM – Marcador de Peso; CP2 - controle positivo; CN – controle negativo.



6.5 ANÁLISE POR BIOLOGIA MOLECULAR COM INICIADORES PARA *Giardia sp.*

6.5.1 DIRETO SEM DIFERENCIAR O MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA

Conforme descrito na seção 5.4 de material e métodos, foram utilizados dois métodos de extração de DNA das amostras ambientais, e os resultados descritos abaixo nesta seção não terão distinção entre eles.

Das 129 amostras ambientais analisadas, apenas 11 (8,6%) foram identificadas por microscopia para *Giardia sp.* ou apresentavam algum indicio de contaminação, desta forma das 28 amostras selecionadas para serem testadas por biologia molecular 21 (75%) apresentaram resultados de amplificação esperada, como positiva para *Giardia sp.* de forma direta, ou seja, apresentaram amplificação da banda de 753 pares em gel de agarose na primeira amplificação. As que foram identificadas como positivas diretamente pela técnica de biologia molecular proposta neste estudo foram: 2; 17; 18; 132; 134; 103;104 (Figura 33); 95; 62; 86; 94; 117; 118; 55; 43; 46; 41 (Figura 34); 7; 16; 42; 49 (Figura 35).

Figura 33. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo *Giardia sp.* Foi observado o amplicon esperado de 753 pares de base nas amostras: Gia 2; Gia Cult; Gia 5; 2;17; 18; 132; 134; 103;104. Sendo, PM – Marcador de Peso; Gia 2; Gia Cult e Gia 5 controle positivos

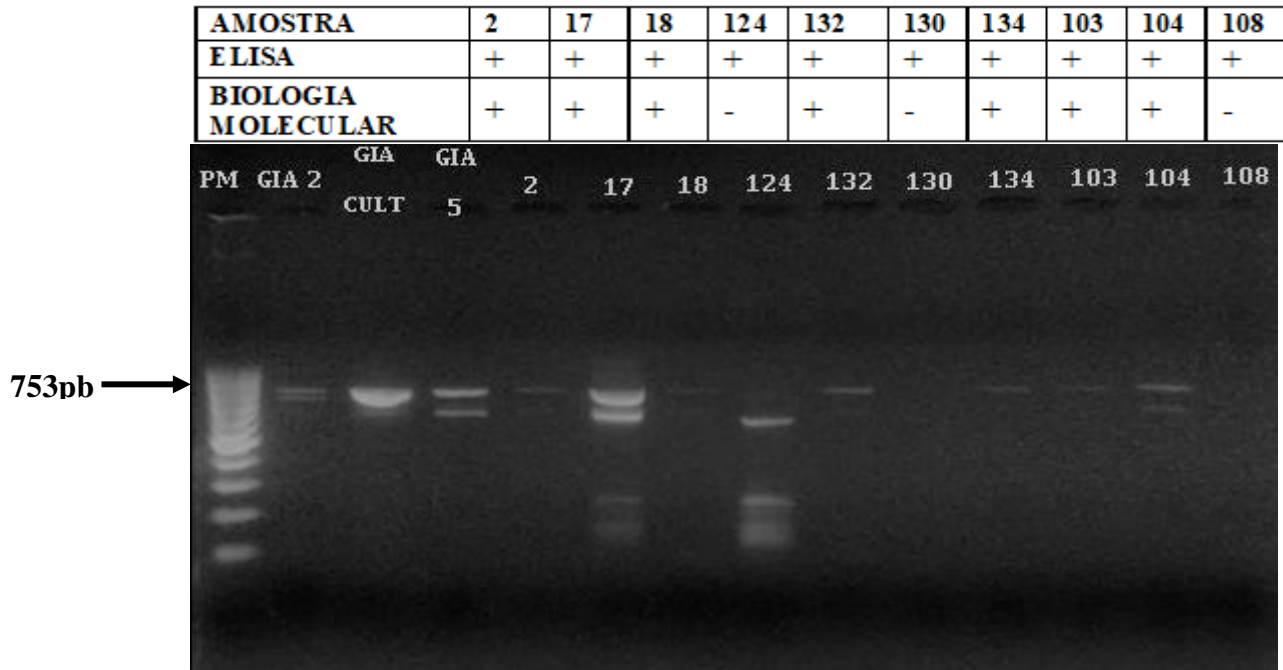


Figura 34. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etidio para análise do produto de PCR do alvo *Giardia sp.* Foi observado o amplicon esperado de 753 pares de base nas amostras: 95; 62; 86; 94; 117; 118; 55; 43; 46; 41.

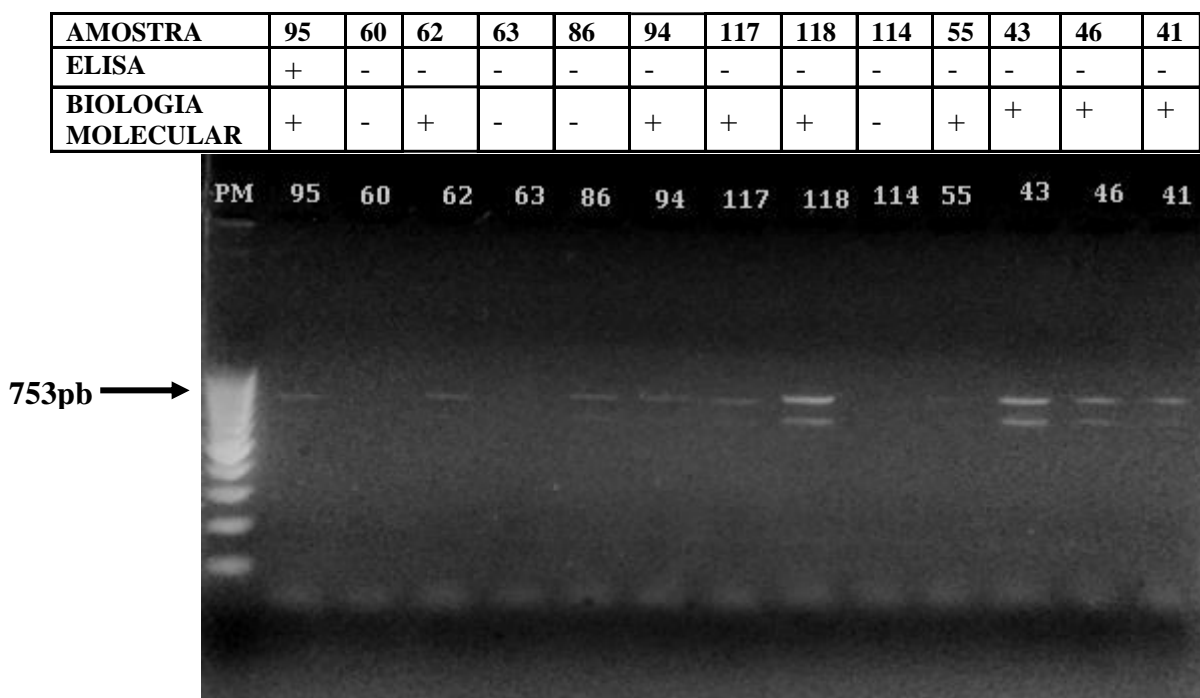
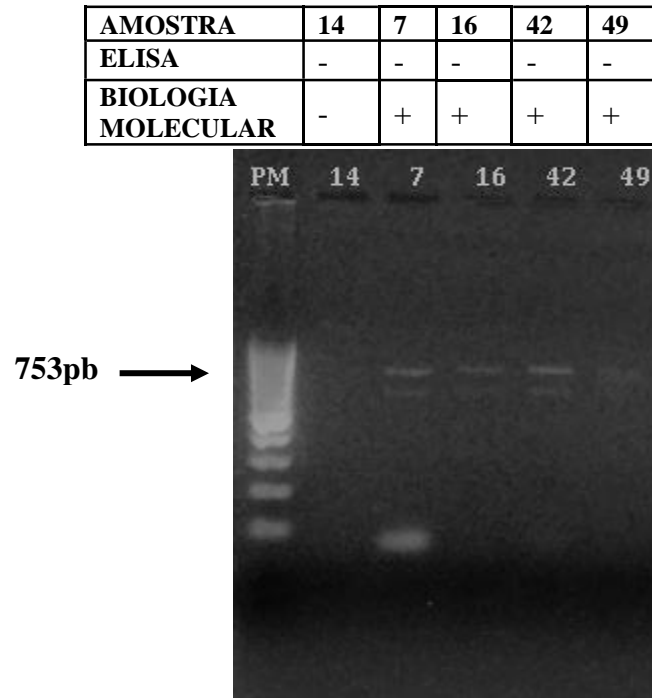
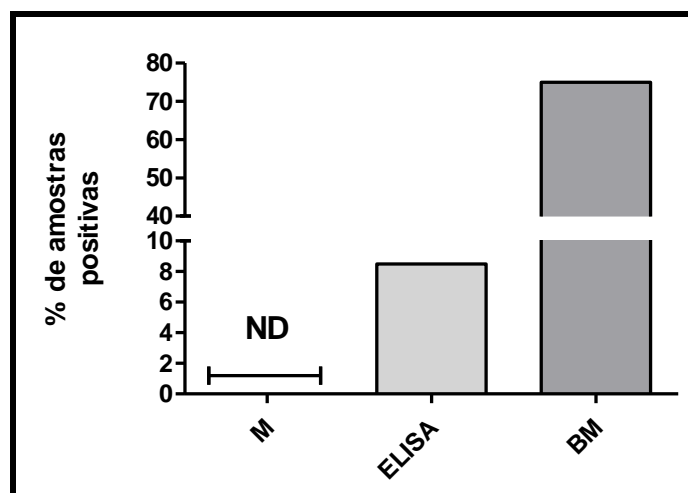


Figura 35. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise do produto de PCR do alvo *Giardia sp.* Foi observado o amplicon esperado de 753 pares de base nas amostras: 7; 16; 42; 49.



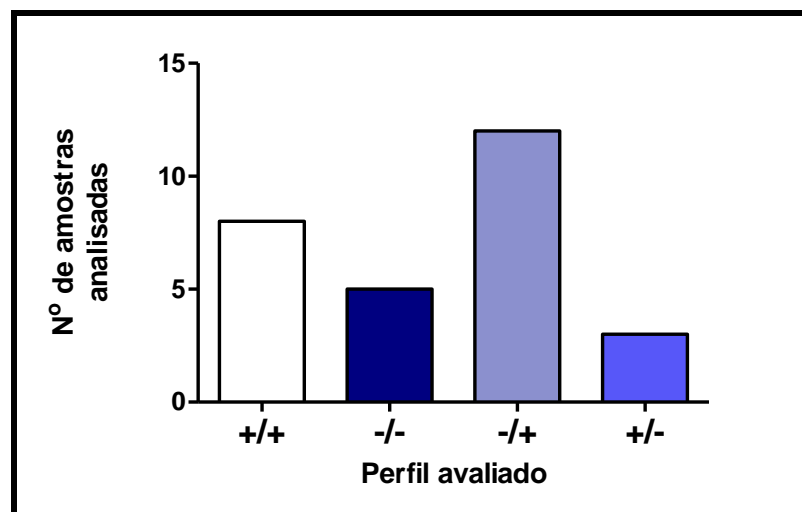
Com o propósito de comparação direta entre os métodos empregados no monitoramento ambiental, a saber, microscopia, ELISA e biologia molecular, demonstrou-se maior sensibilidade da técnica de PCR, apresentando uma taxa de eficiência superior àquela reportada pelos métodos tradicionais (Figura 36)

Figura 36. Percentagem de amostras positivas diagnósticas em matrizes ambientais (areia) nos diferentes métodos testados para *Giardia sp.* M= microscopia; ND= Não detectado; BM= Biologia Molecular.



Essa tendência foi também verificada quando analisamos os perfis das amostras em função aos diferentes métodos de diagnóstico testado. De acordo com o resultado apresentado para o perfil esperado, isto é, amostras negativas para ELISA e positivas para biologia molecular (-/+), a técnica de amplificação por PCR mostrou-se novamente mais sensível em relação ao método tradicional, justificando seu uso em programas de monitoramento ambiental (Figura 37)

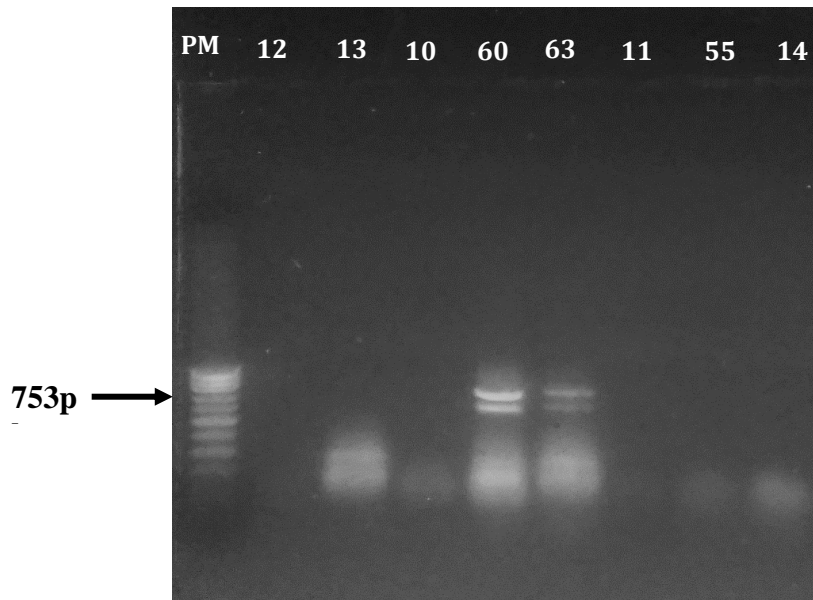
Figura 37. Perfil das amostras ambientais avaliadas pelos diferentes métodos de diagnóstico testados. *Giardia* sp: (+/+) = Amostras positivas para ELISA e biologia molecular; (-/-) = Amostras negativas para ELISA e biologia molecular; (-/+) = Padrão esperado, negativo para ELISA e positivo para biologia molecular; (+/-) = Padrão não esperado, positivo para ELISA e negativo para biologia molecular.



6.5.2 COM REAMPLIFICAÇÃO PARA O ALVO *Giardia* sp.

Das 7 amostras que apresentaram negativas pela PCR direta para o alvo *Giardia* sp, todas foram submetidas a reamplificação. E em 2 (28,6%) foram visualizadas com sucesso o amplicon em gel de agarose na região da banda esperada, sendo elas: 60 e 63 (Figura 38).

Figura 38. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para análise de reamplificação da banda para *Ascaris sp.* Foi observado o amplicon esperado de 753 pares de base nas amostras: 60 e 63.

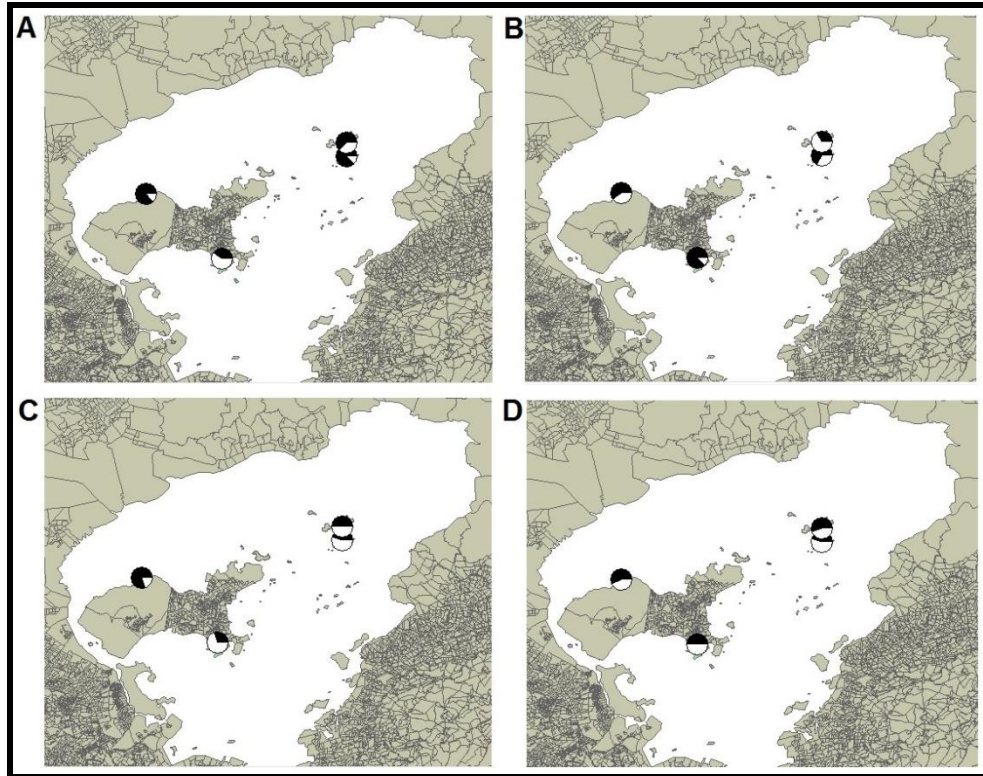


6.6 CONDIÇÕES SANITÁRIAS DA AREIA DAS PRAIAS DA BAÍA DE GUANABARA POR MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

6.6.1 COM OS INICIADORES PARA *Ascaris sp.*

Avaliando os dados encontrados para *Ascaris sp.* por estação do ano, a praia da Bica foi que apresentou mais contaminação durante o período da primavera, com 87% das amostras positivas para esse parasito. Enquanto que a praia do Tubiacanga foi no inverno, com 86% de amostras positivas para *Ascaris sp.* Para as praias da Ilha de Paquetá, a praia de José Bonifácio teve mais amostras positivas para esse alvo no inverno com 87,5% e a praia de Tamoios foi na primavera, com 67% de amostras positivas para esse alvo (Figura 39).

Figura 39. Percentual de Identificação de *Ascaris sp.* por Biologia Molecular nas 4 praias. Nas estações: A – inverno; B – primavera; C- verão; D – outono. Preto – Positiva para *Ascaris*; Branco – Negativa para *Ascaris*.



7 DISCUSSÃO

Segundo a OMS (2009), dentre as doenças negligenciadas de maior interesse no panorama brasileiro, a ascaríase, ancilostomíase, amebíase e giardíase assumem maior importância, em razão a elevada incidência em que são observadas.

Neste contexto, as avaliações das condições de vida, como a situação da moradia e do saneamento básico oferecido à população são, em grande parte, determinantes da transmissão de tais parasitos, uma vez que, muitos desses agentes, como *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* são transmitidos pela água ou alimentos contaminados, enquanto outros, como *Ancylostoma duodenale* e *Strongyloides stercoralis*, são transmitidos por larvas presentes no solo (NEVES, 2005). Em todos os casos, o processo de contaminação fecal favorece diretamente o ciclo evolutivo desses parasitos, tornando uma determinada população mais vulnerável a aquisição de doenças (CAIRNCROSS et al, 1996).

Segundo a literatura, diversos estudos têm apontado a participação de parques, praças públicas, *playgrounds* e areia de praias como importantes elementos envolvidos na cadeia de transmissão de doenças, especialmente ocasionadas por geo-helminhos (CÁCERES et al., 2005; MORO et al., 2008). Tal fato decorre em função as características observadas nesses nichos, favorecendo não apenas o completo desenvolvimento parasitário, mas também, garantindo a manutenção de focos ativos de transmissão. Nesses ambientes, animais como cães e gatos costumam com frequência depositar suas fezes, favorecendo a dispersão de estruturas parasitárias que no meio, poderão infectar outros animais ou mesmo o homem. Nesta esfera, a população infantil corresponde o grupo mais susceptível, pois são as mais expostas ao solo contaminado quando em atividade recreativa, facilitando a ingestão de ovos e outras estruturas parasitárias infectantes (SOTERO-MARTINS et al, 2014).

Cabe ainda ressaltar que a presença de enteroparasitos no solo e na água, além de sua importância específica, é um importante indicador biológico de contaminação fecal, servindo de alerta para a transmissão de outros agentes como os enterovírus, o vírus da hepatite A e as enterobactérias, com repercussões também sobre o organismo humano. Além disso, os ovos dos helmintos parasitos, por serem maiores, mais resistentes e mais fáceis de serem evidenciados no ambiente, fornecem indicação segura da contaminação fecal atual ou recente, podendo constituir-se em coadjuvante necessário a um adequado monitoramento sanitário do meio (SILVA et al, 1991).

A técnica da PCR tem sido aplicada para diagnóstico de várias doenças infecto-

parasitárias. Ainda que apresente dificuldades metodológicas, sobretudo referentes à inibição de reação e/ou contaminação ambiente por DNA do próprio laboratório, a reação tem alta sensibilidade e confiabilidade (GONÇALVES, 2002). Esta técnica tem a vantagem de permitir a caracterização genotípica das espécies de parasitos responsáveis por surtos e agravos, fornecendo subsídios para investigação de prováveis fontes e via de transmissão (GOMES et al., 2004). Recentemente, tal técnica tem sido aplicada com sucesso para o monitoramento de matrizes ambientais, especialmente no que diz respeito à contaminação parasitológica, permitindo diagnosticar diferentes agentes infecciosos mesmo quando presentes em pequenas concentrações no meio. Segundo Fernandes (2009), a aplicação do método molecular PCR permitiu identificar diferentes isolados de *Giardia sp.* nas amostras de água e esgoto provenientes do Estado de São Paulo, validando sua utilização em programas de monitoramento ambiental.

Nesse trabalho, foi proposto um novo protocolo para o diagnóstico de matrizes ambientais a partir da padronização de métodos moleculares pela técnica de PCR, visando à detecção de DNA de parasitos, como importante ferramenta auxiliar no monitoramento de bioindicadores de risco a saúde humana. No entanto, para seu sucesso é necessário conhecer previamente a sequência de ácido nucléicos que se pretende amplificar, como base a construção de iniciadores “*primers*” que iniciará o processo de síntese *in vitro* do gene em questão (SAMBROOK, 2001). Por isso a ferramenta BLAST da base de dados do NCBI foi utilizada para determinar em qual região da sequência consenso ela apresentava-se mais conservada entre as espécies do gênero de interesse (ZAHA, 2014), sendo esta selecionada para o emprego da técnica.

A sequência de *Ascaris sp.* foi gerada a partir de genomas mitocondriais, que têm sido propostos como importante ferramenta no fornecimento de informações acerca de genética de populações, estudos de sistemática e evolução (Hu e Gasser 2006).

Uma das etapas principais da técnica de PCR é a obtenção de DNA de boa qualidade, principalmente de amostras ambientais. Entretanto, duas foram as dificuldades encontradas para diagnosticar molecularmente os parasitos testados. O primeiro aspecto faz referência à estrutura e organização das formas parasitárias encontradas no ambiente que são provenientes de fezes do hospedeiro. Em ambos os casos, ovos de *Ascaris sp.* e cistos de *Giardia sp.*, caracterizam por apresentar paredes relativamente espessas constituído por 3 e 2 camadas, respectivamente. Este fato torna as estruturas resistentes ao rompimento comprometendo assim, a liberação do DNA. Outro complicador importante faz referência aos substratos em que tais estruturas parasitárias são encontradas. Nos dois casos, ovos e cisto, são encontrados

no solo, água ou fezes o que dificulta o processo de isolamento e purificação de DNA, limitando a sensibilidade da técnica. Adicionalmente, inúmeros trabalhos têm destacado a presença de contaminantes inibidores como, carboidratos e produtos químicos, presentes em matrizes ambientais, condição que compromete diretamente a eficácia do método (HIGGINS et al., 2001). Neste caso, etapas adicionais antes da amplificação fazem-se necessário, possibilitando aumentar a sensibilidade da técnica (RIMHANENFINNE et al., 2002).

Em nosso trabalho, dois métodos de extração foram utilizados para o diagnóstico molecular de *Ascaris lumbricoides* em areia de praia. Tais métodos interferiram diretamente na sensibilidade da PCR, confirmando, portanto, ser uma etapa decisiva no processo de amplificação. O primeiro protocolo utilizado na etapa de extração baseou-se nas indicações definidas pelo Método 1 otimizado para amostras ambientais. Neste, a etapa de lise celular e adsorção de impurezas em matrizes foi constituído pela adição da proteinase K e de comprimidos de Inhibitex. Tais constituintes catalisam etapas importantes durante a execução do método, destacando a ação degradativa da enzima, permitindo a exposição de ácidos nucleicos que compõem o material genético do agente, além de sua capacidade inibitória, suprimindo a atuação de nucleases que podem degradar moléculas de DNA e RNA durante etapa de purificação. Outro aspecto importante associado a esse protocolo foi a capacidade de neutralizar possíveis inibidores da PCR aumentando sua sensibilidade. A partir desse protocolo bandas de amplificação foram observadas em diferentes amostras, confirmando a contaminação fecal do meio.

O segundo protocolo testado por nós seguiu as indicações estabelecidas pelo Método 2. Sua principal característica foi quanto a concentração do sal ser baixa, a reidratação com a matriz de sílica é quebrada. O fato da ligação do DNA acontecer com alta concentração de sal e eluir com água ou tampão de baixa concentração de sal, torna o método ótimo como método de purificação. Apesar de sua elevada eficácia na geração de bandas amplificadas em amostras biológicas, apresentam em sua formulação impurezas residuais capazes de inibir a atividade de enzimas relacionadas na modificação adicional da molécula de DNA. Esta condição reduz sua eficácia, especialmente em amostras ambientais com baixa concentração de DNA, comprometendo a etapa de amplificação.

Leles et al. (2009) também confirmam a elevada eficácia do protocolo definida pelo Método 1 para o diagnóstico molecular de *A. lumbricoides* a partir de amostras fecais de humanos. De acordo com os resultados, tal protocolo gerou bandas amplificadas em 100% das amostras estudadas, mostrando-se altamente sensível para a detecção do parasito, mesmo quando as concentrações de ovos foram baixas. Adicionalmente, a associação de métodos

químicos e físicos empregados na etapa de extração de DNA mostraram-se amplamente favorável, sendo capaz de diagnosticar 100% das amostras fecais.

Na literatura existem vários trabalhos propondo diferentes protocolos de extração de DNA para parasitos encontrados no solo e na água. Segundo eles, tais métodos podem ser enquadrados em 3 grupos principais: 1) químicos: utilizando digestão alcalina e fenol/clorofórmio (XIAO et al., 2002; ALVES et al., 2003); 2) métodos físicos: utilizando pérolas de zircônia com sílica ativada ou pérolas de vidro (McLAUHLIN et al., 1999); e finalmente o método 3, baseado na associação dos princípios físicos e químicos (ENEMARK et al., 2002). A eficácia e sensibilidades desses métodos variam significativamente considerando não somente o tipo de amostra estudada, mas também as espécies de parasitos pesquisados.

A adaptação proposta na metodologia neste trabalho tem como objetivo principal facilitar e incentivar a reintrodução da técnica de biologia molecular nos trabalhos rotineiros laboratoriais para matrizes ambientais, pois quando associados a outros métodos poderá enriquecer e aumentar o diagnóstico de parasitos tanto de interesse médico quanto veterinário.

Com o propósito de confirmar os resultados que se apresentaram inicialmente negativos para a PCR, optamos por uma estratégia de reamplificação por meio da excisão das regiões correspondentes à banda esperada no gel de agarose, onde pode-se observar que para algumas amostras o resultado foi positivo. Uma metodologia semelhante foi utilizada por (Lima, 2007) onde realizou a reamplificação e visualização em gel de agarose e de poliacrilamida desnaturante dois fragmentos do cDNA, amplificados por PCR. As bandas dos fragmentos utilizadas no estudo, que foram excisadas do gel de poliacrilamida, foram reamplificadas e visualizadas com sucesso em gel de agarose 1,5% e poliacrilamida, não sendo observadas contaminações entre as bandas.

Segundo estudo de Amaral (2012), tais resultados relacionados com as condições sanitárias da areia das praias da Baía de Guanabara por métodos de biologia molecular, provavelmente decorrem de condições climáticas como a pluviosidade e a movimentação eólica, atuando como fatores determinantes para o desenvolvimento e dispersão de ovos de helmintos. No trabalho de Rocha (2007) onde foi realizado um estudo comparativo com a pluviosidade, mostra nitidamente o aumento de ovos e larvas de helmintos nos meses posteriores a grandes picos pluviométricos, indicando uma relação da contaminação ambiental com a estação das chuvas e elevadas umidades. Em virtude da matriz ambiental utilizada provir de áreas que naturalmente apresentam umidade relativa elevada em todo ano, essa pequena variação observada na frequência de amostras positivas entre as estações

provavelmente decorrem de outros parâmetros ambientais, destacando especialmente temperatura e movimentação eólica.

Deve-se salientar o fato que os ovos dos geo-helminthos necessitam de um ambiente propício: boa oxigenação, alta umidade (>90%) e temperatura entre 20°C e 30°C. Essas condições são indispensáveis para que se processe a embriogênese, a formação da larva, e em alguns casos, a eclosão da larva no meio ambiente (SOTERO-MARTINS, 2014).

8 CONCLUSÕES

- Os marcadores moleculares propostos apresentaram sensibilidade capaz de detectar parasitos alvos (*Ascaris sp.* e *Giardia sp.*) considerados poluidores biológicos em amostras ambientais;
- Os oligonucleotídeos espécie-específicos desenhado e proposto neste trabalho mostraram eficientes na identificação das cepas de *Ascaris sp.*
- Os oligonucleotídeos espécie-específicos propostos para *Giardia sp* foi adequado para identificar esses em amostras ambientais;
- Os métodos de extração de DNA que foram adaptados foram eficientes para extrair DNA de amostras ambientais;
- Esse estudo foi capaz de avaliar de forma qualitativa contaminação ambiental das praias estudadas;
- A positividade para *Ascaris sp.* e *Giardia sp.* nas amostras estudadas constituem um importante marcador biológico de contaminação fecal humana e de animais errantes, sinalizando para possíveis transmissões de outros agentes infecciosos;
- As condições sanitárias relacionadas com parasitos presentes em praias precisam ser investigadas e monitoradas, para informar a população sobre os riscos encontrados nesses ambientes, e para que o órgão público possa oferecer condições de melhoria desses ambientes. E a identificação pode ser feita de forma rápida por métodos de biologia molecular investigadas nesse estudo.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL.; ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. **Biologia Molecular Básica**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- ALVES, M.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; LAL, A.A.; MATOS, O.; ANTUNES, F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoorumnants in Portugal. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.2744-2747, 2003.
- AMARAL, L.S. **Monitoramento de parasitos e coliformes como parâmetros de avaliação sanitária de areia e água de praias da Baía de Guanabara** [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca; Fundação Oswaldo Cruz; 2012.
- AMARAL, L.S.; DUARTE, A.N.; LAURENTINO-SILVA, V; PINNA, L.C.L.; SOTERO-MARTINS, A. Parasitological Indicators of Contamination at Sand of Beaches and Monitoring by Traditional Methods and Immunoenzymatic assay. **Brazilian Journal Biosystems Engineering**, v.9, p.304-311, 2015.
- ARAÚJO, N. S.; RODRIGUES, C.; CURY, M. Helminthes in sandboxes of day care centers of a city in Southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública** v.42, p.150-153, 2008.
- ASAOLU, S.O.; HOLLAND, C.V.; CROMPTON, D.W. Community control of *Ascaris lumbricoides* in rural Oyo State, Nigeria: mass, targeted and selective treatment with levamisole. **Parasitology**,v.103, p.291-294, 1991.
- ASSIS, M. et al. Prevalência de enteroparasitos em moradores de vilas periféricas de Porto Alegre. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.35, n. 4, p. 215-213, 2003.
- BASSO, R.M.C.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; SOLIGO, D.S.; RIBACKI, S.I.; CALLEGARI-JACQUES, S.M. Evolution of the prevalence of intestinal parasitosis among school children in Caxias do Sul, RS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p. 263–68, 2008.
- BAPTISTA,S.C.; BREGUEZ, J.M.M.; BAPTISTA, M.C.P.; SILVA, G.M.S.; PINHEIRO, R.O. Análise da incidência de parasitoses intestinais no município de Paraíba do Sul, RJ. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.38, p. 271-273, 2006.
- BETHONY, J.R.; BROOKER, S.; ALBONICO, M.; GEIGER, S.M.; LOUKAS, A.; DIEMERT, D.; HOTEZ, P.J. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**, v.367, p.1521-1532, 2006.
- BLACK, R.E.; DYKES, A.C.; SINCLAIR, S.P.; WELLS, J.G. Giardiasis in day-care centers: evidence of person-to-person transmission. **Pediatrics**, v.60, p.486–491, 1977.
- BONILLA, T. D.; NOWOSIELSK, K.; AUVELIER, M.; HARTZ, A.; GREEN, M. Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure. *Marine Pollution Bulletin*, v.54, p.1472-1482, 2007.

CÁCERES, A.P.S.G.; GONÇALVES, F.A.; CAZORLA, I.M.; CARVALHO, S.M.S. Contaminação do solo por helmintos de importância médica na praia do Sul (Milionários), Ilhéus-BA. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.37, p.53-55, 2005.

CACCIO,S.M.; DE GIACOMO,M.; POZIO, E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.1023-1030, 2001.

CAMPOS, M.R.; VALENCIA, L.I.O.; FORTES, B.P.M.; BRAGA, R.C.C.; MEDRONHO, R.A. Distribuição espacial da infecção por *Ascaris lumbricoides*. **Revista de Saúde Pública**, v.36, p.69-74, 2002.

CARVALHO, F. M.; FALCÃO, A. O.; ALBURQUERQUE, M. C.; SILVA, P.; BASTOS, O. M. P.; UCHÔA, C. M. A. Diagnóstico Coproparasitológico: estudo comparativo entre métodos de Faust e cols., Lutz, Baermann-Moraes, Coprotest. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.34, p.75-77, 2002.

CASSENOTE, A.J.F.; NETO, J.M.P.; LIMA-CATELANI, A.R.A., FERREIRA, A.W. Soil contamination by eggs of soil-transmitted helminths with zoonotic potential in the town of Fernandópolis, State of São Paulo, Brazil, between 2007 and 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p.371-374, 2011.

Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA. Ministério do Meio Ambiente Resolução no274, de 29 de novembro de 2000. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 25 jan. 2001; Seção 1, p. 70-71.

CÔRTEZ, M. B. V. Gestão da qualidade da água para consumo humano:diagnóstico microbiológico e parasitário dos rios Macacu, Caceribu e Guapi-Macacu. Niterói, 2010. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal Fluminense.

COTTON, J.A.; BEATTY, J.K.; BURET, A.G. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. **International Journal for Parasitology**, v.41, p. 925-33, 2011.

COSTA-MACEDO, L.M.; MACHADO-SILVA, J.R.; RODRIGUES SILVA, R.; OLIVEIRA, L.M.; VIANNA, M.S.R. Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.14, p.851-5, 1998.

CORADI, S.T. Epidemiologia **das parasitoses intestinais e caracterização genotípica de isolados de *Giardia duodenalis* de Escolares do Município de Pratânia, Estado de São Paulo** [Tese de Doutorado]. Botucatu. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Faculdade de Medicina de Botucatu; Unesp, 2010.

CRAUN, G.F.; HUBBS, S.A.; FROST, F.; CALDERON, R.L.; VIA, S.H. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. **Journal American Water Works Association**, v.90, p. 81-91, 1998.

CVJETANOVIC, B. Health effects and impact of water supply and sanitation. **World Health Statistics Quaterly**, v.39, p.105-117, 1986.

DA SILVA, B.A.; ANTUNES, U.C.; LAURENTINO, S.V.; NASCIMENTO, A.D.; BANDEIRA, V.M.; MONTEIRO, F.A.B.; PEREIRA, B.M. Comparative study of parasitological techniques and ELISA for analysis environmental samples, RJ, Brazil. **Revista Ibero-Latinoam Parasitology**, v.71, p.90-96, 2012.

DE MOURA, M.Q.; JESKE, S.; VIEIRA, N.J.; CORRÊA, G.T.; BERNE, A.; VILLELA, M.M. Frequency of geohelminths in public squares in Pelotas, RS, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, p.175-178, 2013.

DE SILVA, N.R.; BROOKER, S.; HOTEZ, P.J.; MONTRESOR, A.; ENGELS, D. Soil transmitted helminth infections: updating the global picture. **Trends Parasitology**, v.19, p.547-51, 2003.

de SILVA, N.R.; CHAN, M.S.; BUNDY, D.A. Morbidity and mortality due to ascariasis: re-estimation and sensitivity analysis of global numbers at risk. **Tropical Medicine and International Health**, v.2, p.519-528, 1997.

DRAKE, L.J.; JUKES, M.C.H.; STERNBERG, R.J.; BUNDY, D.A.P. Geohelminth Infections (Ascariasis, Trichuriasis, and Hookworm): Cognitive and developmental impacts. **Semin Pediatr Infect Dis**, v.11, p.245-51, 2000.

EGLER, C. A.; CRUZ, C. B. M.; MADSEN, P. F. H.; COSTA, S. M.; SILVA, E. A. Proposta de zoneamento ambiental da Baía de Guanabara. **Anuário do Instituto de Geociências – UFRJ**, v.26, p.127-138, 2003.

ENEMARK, H.L.; AHRENS, P.; JUEL, C.D.; PETERSEN, E.; PETERSEN, R.F.; ANDERSEN, J.S.; LIND, P.; THAMSBORG, S.M. Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. **Parasitology**, v.145, p.331-341, 2002.

FERNANDES, L.N. Caracterização molecular de isolados de *Giardia* de amostras de água e esgoto provenientes do Estado de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo: Programa de Pós-graduação em saúde pública; Universidade de São Paulo; 2009.

FERREIRA, C.S.; FERREIRA, M.U.; NOGUEIRA, M.R. Prevalence and intensity of *Ascaris lumbricoides* infections in an urban population sample (São Paulo, Brazil). **Caderno de Saúde Pública**, v.7, p.82-89, 1991.

FORTES, B.P.M.D, VALENCIA, L.I.O, RIBEIRO, S.V, MEDRONHO, R.A. Modelagem geoestatística da infecção por *Ascaris lumbricoides*. **Caderno de Saúde Pública**, v.20, p.727-34, 2004.

GALE, P.; STANFIELD, G. *Cryptosporidium* during a simulated outbreak. **Journal American Water Works Association**, v.92, p.105-116, 2000.

GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? **Experimental Parasitology**, v.124, p.98-106, 2010.

GODINHO, V.M. Helminhos e viabilidade de *Ascaris* sp em lodos anaeróbicos in natura e submetidos à higienização por caleação e por tratamento térmico [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte, Minas Gerais. Universidade Federal de Minas Gerais; UFMG; 2003.

GOMES, A. H. S. Detecção de *Cryptosporidium* em amostras fecais por técnica de Nested – PCR e comparação com métodos imunológicos e parasitológicos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v.2. n. 63. p. 255-260, 2004.

GONÇALVES, M. L. C.. Helminhos, protozoários e algumas idéias: novas perspectivas na paleoparasitologia. [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro. Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, RJ. 2002.

GRECA, M. P. S. **Identificação molecular e filogenia de espécies de *Cryptosporidium* em cães e em gatos de Curitiba e região metropolitana.** [Dissertação de Mestrado]. Curitiba. Universidade Federal do Paraná, 2010.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M.I.L. Ocorrência de *Giardia lamblia* em crianças atendidas em creches municipais de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.37, p.501-6, 1995.

HIGGINS, J.A.; JENKINS, M.C.; SHELTON, D.; FAYER, R.; KARNS, J.S. Rapid extraction of DNA from *Escherichia coli* and *cryptosporidium parvum* for use in PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.5321-5324, 2001.

HOTEZ, P.J.; FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; MALYNEUX, D.H. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. **The Lancet**, v.373, p.1570-1575, 2009.

HOLLM-DELGADO, M.G.; GILMAN, R.H. Lack of an adverse effect of *Giardia intestinalis* infection on the health of Peruvian children. **American Journal Epidemiology**, v.168, p.647-55, 2008.

ISAAC-RENTON, J.L.; PHILION, J.J. Factors associated with acquiring giardiasis in British Columbia residents. **Canada Journal Public Health**, v.83, p.155–158, 1992.

JARDIM-BOTELHO, A.; BROOKER, S.; GEIGER, S.M.; FLEMING, F.; LOPES, A.C.S. Age patterns in undernutrition and helminth infection in a rural area of Brazil: associations with ascariasis and hookworm. **Tropical Medicine International Health**, v.13, p.458–67, 2008.

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

LELES, D. **Paleogenética e Paleopidemiologia de *Ascaris* sp.(Linnaeus, 1758) e *Trichuris* sp.(Roederer, 1761).** [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca; Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

LELES, D.; ARAÚJO, A.; VICENTE, A.C.; IÑIQUEZ, A.M. Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new *Ascaris* sp. genotype in Brazil.

Veterinary Parasitology, v.163, p.167-170, 2009.

LIMA, R.S.N.; de SANTOS, C.A.F.; BATISTA, P.P.; RODRIGUES, M.A. Reamplificação de fragmentos do cDNA do gene da lacrimação da cebola amplificado por PCR e excisados de gel de poliacrilamida. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 27-35, 2007.

LOPEZ, C.E.; DYKES, A.C.; JURANEK, D.D. Waterborne giardiasis: a communitywide outbreak of disease and a high rate of asymptomatic infection. **American Journal Epidemiology**, v.112, p.495–507, 1980.

LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; MILLAR, B.C.; MCCORRY, K.A.; XU, J.; ROONEY, P.J.; DOOLEY, J.S. Occurrence and molecular genotyping of *Cryptosporidium* spp. in surface Waters in Northern Ireland. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.774-779, 2001.

MANDARINO-PEREIRA, A.; DE SOUZA, F.S.; LOPES, C.W.; PEREIRA, M.J. Prevalence of parasites in soil and dog feces according to diagnostic tests. **Veterinary Parasitology**, v.170, p.176-181, 2010.

MARCHIORO, A.; COLLI, C.M.; FERREIRA, C.E.; TIYO, R.; MATTIA, S.; DE SOUZA, W.F.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Identification of public areas with potential toxocaríasis transmission risk using Geographical Information Systems. **Acta Parasitologica**, v.58, p.328-333, 2013.

MATESCO, V. C.; MENTZ, M. B.; ROTT, M. B.; SILVEIRA, C. O. Contaminação sazonal por ovos de helmintos na praia de Ipanema, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Patologia Tropical*, v.35, p.135-141, 2006

MITREA, I.L. Parazitologie úi boli parazitare. Ed. Ceres, Bucureúti, 2011.

MONTEIRO, C.A.; CHIEFFI, P.P.; BENÍCIO, M.H.A.; DIAS, R.M.S.; TORRES, D.M.A.G.V.; MANGINI, A.C.S. Estudo das condições de saúde das crianças do Município de São Paulo (Brasil), 1984/1985. VII. Parasitoses intestinais. **Revista de Saúde Pública**, v.22, p.8-15, 1988.

MONS, C.; DUMETRE, A.; GOSSELIN, S.; GALLIOT, C.; MOULIN, L. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. **Water research**, v.43, p.211-217, 2009.

MORO, F.C.B.; PRADEBON, J.B.; SANTOS, H.R.; QUEROL, E. Ocorrência de *Ancylostoma* spp. e *Toxocara* spp. em praças e parques públicos dos municípios de Itaqui e Uruguaiana, Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul. **Biodiversidade Pampeana**, v.6, p.25-29, 2008.

NEVES, D. P. Parasitologia Dinâmica. São Paulo: Atheneu, 2003.

NIKAEEN, M.; MESDAGHINIA, A.R.; TEHRANI, M.J.; REZAEIAN, M.; MAKIMURA, K. A Nested-PCR Assay for Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Water Samples. **Iranian Journal of Public Health**, v.34, p. 13-18, 2005.

NYGARD, K.; SCHIMMER, B.; SOBSTAD, O. A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a non-endemic urban area. **BMC Public Health**, v.6, p.141, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global report for research on infectious diseases of poverty. Geneva, 2012.

Pan American Health Organization (2009). Resolution CD49. R9. Elimination of Neglected Diseases and Other Poverty-Related Infections. Forty-ninth Directing Council. Washington DC: PAHO. Disponível: [http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/CD49.R19%20\(Eng.\).pdf](http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/CD49.R19%20(Eng.).pdf). Acessado em Junho de 2016.

PEREIRA, C.W.; SANTOS, F.N. Prevalência de geo-helminthíases em crianças atendidas na rede pública de saúde de Neópolis, município do estado de Sergipe. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.37, p.111-114, 2005.

PEREIRA, J.T. Métodos de desinfecção em água contendo *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporididae) e sua detecção por técnica de Biologia Molecular [dissertação de mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia; 2007.

RENDTORFF, R.C.; HOLT, C.J. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. IV. Attempts to transmit *Endamoeba coli* and *Giardia lamblia* cysts by water. **American Journal Hyg**, v.60, p.327–38, 1954.

REY, L. Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

REYNOLD, K. A.; MENA, K. D.; GERBA, C. P. Risk of waterborne illness via drinking water in the United states. *Rev Environ Conn Toxicol*, v.192, p.117-158, 2008.

RIMHANEM-FINNE, R.; HORMAN, A.; RONKAINEN, P.; HANNINEM, M.L. An IC-PCR method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural surface water in Finland. **Journal of Microbiological Methods**, v.50, p.299-303, 2002.

SABOYÁ, M.I.; CATALÁ, L.; NICHOLLS, R.S.; AULT, S.K. Update on the mapping of prevalence and intensity of infection soil-transmitted helminth infections in Latin America and the Caribbean: A Call for action. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.7, p.e2419, 2013.

SANTANA, A.L.; VITORINO, V.V.; ANTONIO, V.E.; MOREIRA, T.R.; GOMES, A.P. Atualidade sobre giardiase. **Infectologia**, v.102, p.07-12, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. "Molecular Cloning – A Laboratory Manual," 3rd ed., vol. 2, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, pp. 8.04 – 8.102.

SARINAS, P.S.; CHITKARA, R.K. Ascariasis and hookworm. **Semin Respir Infect**, v.12, p.130-135, 1997.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends Parasitology**, v.22, p.203-8, 2006.

SHAW, P.K.; BRODSKY, R.E.; LYMAN, D.O. A communitywide outbreak of giardiasis with evidence of transmission by a municipal water supply. **Ann Intern Med**, v.87, p.426-32, 1977.

SILVA, J.C.; FURTADO, L.F.; FERRO, T.C.; BEZERRA, K.; BORGES, E.P.; MELO, A.C.F. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* e seus aspectos epidemiológicos em crianças do Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p.100-102, 2011.

SILVA, J. P.; MARZOCHI, M. C. A.; SANTOS, E. C. L. Avaliação da contaminação experimental de areias de praias por enteroparasitas. Pesquisa de ovos de Helminthos. Cad. Saúde Pública, v. 7, n. 1, p. 90-99. 1991.

SILVA, P. F.; CAVALCANTI, I. M. D.; IRMÃO, J. I.; ROCHA, F. J. Common beach sand contamination due to enteroparasites on the southern coast of Pernambuco state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.51, p.217-218, 2009.

SMITH, H.V.; CACCIO, S.M.; TAIT, A.; McLAUHLIN, J.; THOMPSON, R.C.A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v.22, p.160-167, 2006.

SPRENGER, L.K.; GREEN, K.T.; MOLENTO, M.B. Geohelminth contamination of public areas and epidemiological risk factors in Curitiba, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.23, p.69-73, 2014.

SELTZER, E. Ascariasis. In: Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice. 1st ed, Guerrant, RL, Weller, PF (Eds), Philadelphia: Churchill Livingstone; 1999.

SHUMAN, E. K. Global climate change and infectious diseases. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, Mass., v. 362, p. 1061-1063, 2010.

TUDOR, P. Soil contamination with canine intestinal parasites eggs in the parks and shelter dogs from Bucharest área. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v.6, p. 387-391, 2015.

VASCONCELOS, R.S.; KOVALESKI, D.F.; TESSER-JUNIOR. Doenças negligenciadas: Revisão da literatura sobre as intervenções propostas. **Saúde e Transformação Social**, v.6, p. 114-131, 2016.

WARD, H.D. Intestinal protozoal parasites and diarrheal disease in Bangladesh. **Clinical Infection Disease**, v.48, p.1198-1200, 2009.

WHITE, K.E.; HEDBERG, C.W.; EDMONSON, L.M.; JONES, D.B.; OSTERHOLM, M.T.; MACDONALD, K.L. An outbreak of giardiasis in a nursing home with evidence for multiple modes of transmission. **Journal of Infection Disease**, v.160, p.298-304, 1989.

World Health Organization (2001). Resolution WHA54.19. Schistosomiasis and soil-

transmitted helminth infections. Fifty-fourth World Health Assembly. Geneva: WHO. Available: http://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_54.19.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected tropical diseases, frequently asked questions: what are the neglected tropical diseases? 2009. [site da Internet][acessado 2012 abr 23]. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/faq/en/index.html.

XIAO, L.; SULAIMAN, I.M.; RYAN, U.M.; ZHOU, L.; ATWILL, E.R.; TISCHLER, M.L. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.1773-1758, 2002.

ZUNINO, M. G.; DE FRANCESCO, M. V.; KURUC, J. A.; SCHWEIGMANN, N.; WISNIVESKY-COLLI, M.; CRISTINA, J. O. Contaminación por helmintos en espacios públicos de la provincia de Chubut, Argentina. *Bol Chil Parasitol*, v.55, p.78-83, 2000.

APÊNDICE I
Dados brutos para *Ascaris* sp.

Amostra	Estação	Local	Praia	Colimetria UFC/g	Microscopia	ELISA
4	Verão	PQT	TA	244150	Larva Rab	0
5	Verão	PQT	TA	244150	Larva Fila	0
6	Verão	PQT	JB	327000	Larva Rab	0
1	Verão	IG	BI	108850	0	<i>Cryptosporidium</i>
3	Verão	IG	BI	108850	Larva Fila	
2	Verão	IG	TU	93837,5	0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
7	Verão	IG	BI	1172584,38	Larva Fila e Rab/ <i>Ascaris</i>	0
8	Verão	IG	BI	1172584,38	0	0
9	Verão	IG	TU	548850	0	0
12	Verão	PQT	TA	562450	Larva Fila	0
13	Verão	PQT	TA	562450	Larva Fila	<i>Cryptosporidium</i>
10	Verão	PQT	JB	326250	Larva Fila	<i>Cryptosporidium</i>
11	Verão	PQT	JB	326250	Larva Fila	0
20	Outono	IG	TU	18462,5	0	<i>Cryptosporidium</i>
17	Outono	IG	BI	10893,75	Ancylostoma/ Larva Fila	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
18	Outono	IG	BI	10893,75	Larva Rab	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
27	Outono	PQT	TA	100150	0	<i>Cryptosporidium</i>
24	Outono	PQT	TA	100150	Larva Fila / Larva Rab	<i>Cryptosporidium</i>
26	Outono	PQT	JB	139887,5	0	<i>Cryptosporidium</i>
25	Outono	PQT	JB	139887,5	Larva Rab	0
38	Outono	PQT	TA	197500	<i>Ascaris</i>	0
34	Outono	PQT	TA	197500	Larva Fila	<i>Cryptosporidium</i>
32	Outono	PQT	JB	277500	0	0
35	Outono	PQT	JB	277500	Larva Rab	<i>Cryptosporidium</i>
14	Outono	IG	BI	213312,5	Ancylostoma	<i>Cryptosporidium</i>
15	Outono	IG	TU	25000	Larva Fila	0
16	Outono	IG	BI	213312,5	Larva Fila / Larva Rab	0
39	Primavera	PQT	TA	76837,5	Larva Fila	<i>Cryptosporidium</i>
40	Primavera	PQT	JB	383600	0	<i>Cryptosporidium</i>
41	Primavera	IG	TU	175525	Larva Fila / Larva Rab	<i>Cryptosporidium</i>
42	Primavera	IG	BI	168975	<i>Ascaris</i> / Larva Fila	0
43	Primavera	IG	BI	168975	Larva Fila / Larva Rab	<i>Cryptosporidium</i>
46	Primavera	IG	TU	757550	<i>Ascaris</i> / Larva Fila	<i>Cryptosporidium</i>
44	Primavera	IG	BI	7118,75	<i>Ascaris</i>	<i>Cryptosporidium</i>
45	Primavera	IG	BI	7118,75	0	<i>Cryptosporidium</i>
47	Primavera	PQT	TA	81900	Larva Fila	0
49	Primavera	PQT	TA	81900	<i>Ascaris</i> / Larva Fila	0
48	Primavera	PQT	JB	254625	0	0
50	Inverno	PQT	TA	49287,5	Larva Fila	<i>Cryptosporidium</i>
52	Inverno	PQT	TA	49287,5	Larva Rab	<i>Cryptosporidium</i>

53	Inverno	PQT	JB	106337,5	0	<i>Cryptosporidium</i>
51	Inverno	PQT	JB	106337,5	Larva Fila	0
54	Inverno	IG	TU	3812,5	Larva Rab	<i>Cryptosporidium</i>
55	Inverno	IG	BI	21218,75	<i>Ascaris</i> / Larva Fila	<i>Cryptosporidium</i>
56	Inverno	IG	BI	21218,75	Larva Fila	<i>Cryptosporidium</i>
59	Inverno	PQT	JB	310287,5	Larva Fila	<i>Cryptosporidium</i>
57	Inverno	PQT	TA	57387,5	Larva Fila	<i>Cryptosporidium</i>
58	Inverno	PQT	TA	57387,5	Larva Fila	<i>Cryptosporidium</i>
61	Inverno	IG	TU	2362,5	Larva Fila	<i>Cryptosporidium</i>
62	Inverno	IG	BI	1512,5	Larva Fila / Larva Rab	<i>Cryptosporidium</i>
60	Inverno	IG	BI	1512,5	Larva Fila	<i>Cryptosporidium</i>
124	Outono	IG	TU	30862,5	0	<i>Giardia</i> / <i>Cryptosporidium</i>
131	Primavera	IG	BI	65500	0	<i>Cryptosporidium</i>
121	Outono	PQT	TA	23725	0	<i>Cryptosporidium</i>
132	Primavera	IG	TU	45500	0	<i>Giardia</i> / <i>Cryptosporidium</i>
126	Outono	IG	BI	45500	0	<i>Cryptosporidium</i>
128	Primavera	IG	JB	45500	0	<i>Cryptosporidium</i>
129	Primavera	PQT	TA	45500	0	<i>Cryptosporidium</i>
125	Outono	IG	TU	4522625	0	<i>Cryptosporidium</i>
130	Primavera	PQT	JB	59250	0	<i>Giardia</i> / <i>Cryptosporidium</i>
127	Primavera	IG	TU	1507250	0	<i>Cryptosporidium</i>
122	Outono	IG	BI	3568,75	0	<i>Cryptosporidium</i>
123	Outono	PQT	JB	8537,5	0	<i>Cryptosporidium</i>
139	Inverno	PQT	JB	1356125	0	<i>Cryptosporidium</i>
138	Inverno	PQT	JB	1356125	0	<i>Cryptosporidium</i>
140	Inverno	PQT	TA	69625	0	<i>Cryptosporidium</i>
137	Inverno	PQT	TA	69625	0	<i>Cryptosporidium</i>
134	Inverno	IG	BI	85876,6	0	<i>Giardia</i> / <i>Cryptosporidium</i>
133	Inverno	IG	TU	19875	0	<i>Cryptosporidium</i>
135	Inverno	IG	TU	19875	0	<i>Cryptosporidium</i>
136	Inverno	IG	BI	85876,6	0	<i>Cryptosporidium</i>
72	Verão	IG	BI	891,758696	0	<i>Cryptosporidium</i>
70	Verão	IG	TU	598,7412043	0	<i>Cryptosporidium</i>
71	Verão	IG	BI	891,758696	0	<i>Cryptosporidium</i>
83	Verão	PQT	JB	97,02004264	0	<i>Cryptosporidium</i>
80	Verão	PQT	JB	97,02004264	0	<i>Cryptosporidium</i>
82	Verão	PQT	TA	90	0	<i>Cryptosporidium</i>
81	Verão	PQT	TA	90	0	<i>Cryptosporidium</i>
69	Verão	PQT	TA	626,9152052	0	<i>Cryptosporidium</i>
68	Verão	PQT	TA	626,9152052	0	<i>Cryptosporidium</i>
67	Verão	PQT	JB	629,8168592	0	<i>Cryptosporidium</i>
66	Verão	PQT	JB	629,8168592	0	<i>Cryptosporidium</i>
77	Verão	IG	TU	15,44444444	0	<i>Cryptosporidium</i>
78	Verão	IG	BI	1194,676739	0	<i>Cryptosporidium</i>
79	Verão	IG	BI	1194,676739	0	<i>Cryptosporidium</i>

75	Verão	PQT	TA	594,7629352	0	<i>Criptosporidium</i>
74	Verão	PQT	TA	594,7629352	0	<i>Criptosporidium</i>
76	Verão	PQT	JB	564,8872154	0	<i>Criptosporidium</i>
73	Verão	PQT	JB	564,8872154	0	<i>Criptosporidium</i>
65	Verão	IG	BI	421,1740994	0	<i>Criptosporidium</i>
64	Verão	IG	BI	421,1740994	0	<i>Criptosporidium</i>
63	Verão	IG	TU	208,6071302	<i>Ascaris</i>	<i>Criptosporidium</i>
103	Inverno	IG	TU	1582,11	0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
109	Inverno	IG	BI	-	0	<i>Criptosporidium</i>
112	Inverno	IG	BI	568,02	0	<i>Criptosporidium</i>
102	Inverno	IG	BI	786,17	0	<i>Criptosporidium</i>
106	Inverno	PQT	JB	74,65	0	<i>Criptosporidium</i>
105	Inverno	IG	BI	268,37	0	<i>Criptosporidium</i>
104	Inverno	IG	TU	268,37	0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
101	Inverno	PQT	JB	645,16	0	<i>Criptosporidium</i>
110	Inverno	PQT	TA	-	0	<i>Criptosporidium</i>
108	Inverno	IG	TU	-	0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
111	Inverno	PQT	JB	-	0	<i>Criptosporidium</i>
107	Inverno	PQT	TA	41,56	0	<i>Criptosporidium</i>
87	Outono	IG	BI	437,4083541	0	<i>Criptosporidium</i>
88	Outono	IG	BI	437,4083541	0	<i>Criptosporidium</i>
86	Outono	IG	TU	516,0378949	Larva Rab	<i>Criptosporidium</i>
99	Outono	IG	BI	339,042881	0	<i>Criptosporidium</i>
100	Outono	IG	BI	339,042881	0	<i>Criptosporidium</i>
98	Outono	IG	TU	13,87628412	0	<i>Criptosporidium</i>
89	Outono	PQT	TA	102,9576422	0	<i>Criptosporidium</i>
91	Outono	PQT	TA	102,9576422	0	<i>Criptosporidium</i>
90	Outono	PQT	JB	259,2265319	0	<i>Criptosporidium</i>
92	Outono	PQT	JB	259,2265319	0	<i>Criptosporidium</i>
94	Outono	IG	BI	512,8193643	<i>Ascaris</i>	<i>Criptosporidium</i>
95	Outono	IG	BI	512,8193643	0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
93	Outono	IG	TU	385,9536003	0	<i>Criptosporidium</i>
85	Outono	PQT	JB	421,7271432	0	<i>Criptosporidium</i>
84	Outono	PQT	TA	164,0992081	0	<i>Criptosporidium</i>
97	Outono	PQT	TA	140,7892997	0	<i>Criptosporidium</i>
96	Outono	PQT	JB	909,8065865	0	<i>Criptosporidium</i>
117	Primavera	IG	TU	600,480461	<i>Ascaris</i>	<i>Criptosporidium</i>
120	Primavera	PQT	TA	191,8882307	0	<i>Criptosporidium</i>
119	Primavera	PQT	JB	494,4689029	0	<i>Criptosporidium</i>
118	Primavera	IG	BI	720,5275145	<i>Ascaris</i>	<i>Criptosporidium</i>
113	Primavera	IG	BI	773,8061232	0	<i>Criptosporidium</i>
115	Primavera	PQT	TA	159,4022091	0	<i>Criptosporidium</i>
116	Primavera	PQT	JB	989,7643072	0	<i>Criptosporidium</i>
114	Primavera	IG	BI	773,8061232	<i>Ascaris</i>	<i>Criptosporidium</i>

APENDICE II
Dados Brutos para *Giardia sp.*

Amostra	Estação	Local	Praia	Colimetria UFC/g	Microscopia	Elisa
2	Verão	IG	TU	93837,5	0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
7	Verão	IG	BI	1172584,38	Larva Fila / Larva Rab/ <i>Ascaris</i>	0
17	Outono	IG	BI	10893,75	<i>Ancylostoma</i> / Larva Fila	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
18	Outono	IG	BI	10893,75	Larva Rab	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
14	Outono	IG	BI	213312,5	<i>Ancylostoma</i>	<i>Criptosporidium</i>
16	Outono	IG	BI	213312,5	Larva Fila / Larva Rab	0
41	Primavera	IG	TU	175525	Larva Fila / Larva Rab	<i>Criptosporidium</i>
42	Primavera	IG	BI	168975	<i>Ascaris</i> / Larva Fila	0
43	Primavera	IG	BI	168975	Larva Fila / Larva Rab	<i>Criptosporidium</i>
46	Primavera	IG	TU	757550	<i>Ascaris</i> / Larva Fila	<i>Criptosporidium</i>
49	Primavera	PQT	TA	81900	<i>Ascaris</i> / Larva Fila	0
55	Inverno	IG	BI	21218,75	<i>Ascaris</i> / Larva Fila	<i>Criptosporidium</i>
62	Inverno	IG	BI	1512,5	Larva Fila / Larva Rab	<i>Criptosporidium</i>
60	Inverno	IG	BI	1512,5	Larva Fila	<i>Criptosporidium</i>
124	Outono	IG	TU	30862,5	0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
132	Primavera	IG	TU	45500	0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
130	Primavera	PQT	JB	59250	0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
134	Inverno	IG	BI	85876,6	0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
63	Verão	IG	TU	208,6071302	<i>Ascaris</i>	<i>Criptosporidium</i>
103	Inverno	IG	TU	1582,11	0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
104	Inverno	IG	TU	268,37	0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
108	Inverno	IG	TU		0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
86	Outono	IG	TU	516,0378949	Larva Rab	<i>Criptosporidium</i>
94	Outono	IG	BI	512,8193643	<i>Ascaris</i>	<i>Criptosporidium</i>
95	Outono	IG	BI	512,8193643	0	<i>Giardia / Cryptosporidium</i>
117	Primavera	IG	TU	600,480461	<i>Ascaris</i>	<i>Criptosporidium</i>
118	Primavera	IG	BI	720,5275145	<i>Ascaris</i>	<i>Criptosporidium</i>
114	Primavera	IG	BI	773,8061232	<i>Ascaris</i>	<i>Criptosporidium</i>