

Ovos viáveis de *Ascaris spp* – Determinação pela técnica de centrífugo-flutuação em amostras de lodo de esgoto

Test method for detecting, enumerating and determining the viability of *Ascaris* eggs in sewage sludge

Descreve o método para quantificação de ovos viáveis de *Ascaris spp* pela técnica de centrífugo-flutuação, com aplicação na avaliação da qualidade parasitológica de lodos de esgoto provenientes de estações de tratamento de esgoto doméstico.

Palavras chave

Ascaris spp; ovos viáveis; análise parasitológica; lodo de esgoto

Key words

Ascaris spp; viable eggs; parasitological analysis; sewage sludge

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax: (11) 3133 3402
<http://www.cetesb.sp.gov.br>

Primeira Edição

Junho/2013, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. nº 320/2013/E, de 08/10/2013. Publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo – Caderno Executivo I, v.123, n. 192, de 10/10/2013, Poder Executivo, Seção I, p. 64 a 66.

© CETESB 2013

É permitida a reprodução total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte. Direitos reservados de distribuição.

Sumário	página
1 Introdução.....	2
2 Escopo	3
3 Documentos complementares.....	3
4 Materiais.....	3
5 Reagentes e soluções.....	6
6 Amostragem	8
7 Execução do Ensaio.....	8
8 Controle de qualidade.....	10
9 Referências.....	15

1 Introdução

Ascaris lumbricoides é um helminto, pertencente ao grupo dos nematelmintos (vermes de corpo cilíndrico), que inclui igualmente *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Trichuris trichiura*. São igualmente denominados nematodos transmitidos pelo solo ou geohelmintos. Trata-se de parasitas bastante prevalentes, principalmente em locais onde saneamento e condições de higiene são inadequados. As estimativas apontam que, mundialmente, dois bilhões de pessoas estão infectadas e vários milhões sofrem de morbidade crônica debilitante (Albonico et al. 2006). A transmissão ocorre pelo contato com o solo contaminado com material fecal e a carga de doença é inteiramente atribuível à falta de saneamento e bons hábitos de higiene e, portanto, medidas adequadas para suprir essas deficiências poderiam prevenir integralmente a ocorrência dessas doenças (Prüs-Üstin et al., 2008). Em regiões, onde a infecção é endêmica, ovos infectantes foram encontrados em utensílios utilizados para preparação e consumo de alimentos, frutas, verduras, mobiliário, dinheiro e maçanetas de portas (Crompton, 2001).

A ascaridíase pode ocorrer na forma aguda causando pneumonite durante a fase migratória, desconforto digestivo durante a infecção intestinal e reações alérgicas. Em crianças pequenas, é comum a obstrução intestinal devido ao tamanho dos vermes, que pode atingir 31 x 4 cm (CVE 2001; Crompton 2001). Em sua forma crônica, a ascaridíase interfere no desenvolvimento e crescimento das crianças, principalmente no período entre dois a dez anos de idade (Crompton, 2001).

A transmissão se dá pela ingestão de ovos contendo a larva infectante, comum em ambientes sujeitos à poluição fecal. Após a eclosão dos ovos, as larvas atravessam a parede intestinal e atingem o fígado pelo sistema porta-hepático, onde permanecem cerca de quatro dias, e, em seguida pela linfa e sistema circulatório atingem os pulmões. Após cerca de 14 dias, retornam ao intestino pelos brônquios e traquéia. Decorrem pelo menos 65 dias após a infecção para que os ovos sejam detectados nas fezes (Crompton 2001; CVE 2001). As larvas adultas de *A. lumbricoides* produzem 100.000 a 200.000 ovos fertilizados e não fertilizados por dia. Os ovos requerem um período de maturação no ambiente, favorecido por condições adequadas de temperatura, umidade e proteção da luz solar (Hotez et al., 2003) e igualmente por fatores químicos, tais como pH, nível de oxigênio, presença de outras substâncias químicas, predação por fungos, protozoários e invertebrados (WHO 2004).

Ovos de helmintos podem ser detectados em densidades variáveis em esgoto bruto, na dependência da endemicidade da doença na população humana e animal, da porcentagem da população atendida

pela coleta e tratamento do esgoto, dentre outros fatores (WHO 2004). No lodo de esgoto, densidades e tipos de helmintos encontrados são igualmente influenciados pela taxa de infecção da população local observando-se dessa forma uma ampla faixa de variação entre os resultados relatados por diferentes pesquisadores em várias regiões do mundo. A inexistência de um método analítico padronizado limita a comparação entre tais resultados (WHO, 2004).

Por outro lado, a utilização de lodo de esgoto na agricultura tem sido estimulada nos últimos anos, uma vez que pode ser uma destinação ambientalmente correta, para reduzir o volume de lodo a ser disposto em aterros ou incinerado e também pelo seu efeito benéfico como condicionante e fertilizante do solo (National Academy of Sciences, 2002). Para sua utilização segura com esse objetivo as densidades de microrganismos patogênicos devem ser reduzidas pelos processos de tratamento, de forma a diminuir os riscos de exposição à população por contato direto ou indireto. Devido à impossibilidade de análise de todos os patogênicos potencialmente presentes, organismos representativos e indicadores da eficiência dos processos de tratamento e persistência ambiental são normalmente escolhidos. No caso dos helmintos, são utilizados testes para determinar a presença e viabilidade de ovos de *Ascaris* sp, o mais resistente dos helmintos. Dessa forma, se existem condições nas quais esses ovos não conseguem sobreviver, outras espécies de helmintos (*Toxocara* sp, *Trichuris* sp e *Hymenolepis* sp) não irão igualmente persistir (USEPA 2003).

A legislação americana (USEPA 1994) exige que no lodo de esgoto de boa qualidade (aplicação irrestrita, classe A) os ovos de helmintos estejam abaixo do limite de detecção, o que pode ser demonstrado pelo monitoramento de suas densidades ou pelo controle de variáveis de controle operacional dos processos de tratamento. Já a regulamentação federal brasileira, requer análises desses organismos, dentre outros, para caracterizar microbiologicamente lodos classe A e classe B (Brasil 2006).

2 Escopo

Esta Norma prescreve o método para detecção e quantificação de ovos viáveis de *Ascaris* spp em amostras de lodo de esgoto, com base no método desenvolvido pela Agência Ambiental Americana (USEPA 2003) com as seguintes aplicações:

- Caracterização parasitológica de lodos de esgoto;
- Avaliação da eficiência dos processos de tratamento de lodo de esgoto na inativação dos ovos de *Ascaris* spp

3 Documentos complementares

Os documentos relacionados a seguir contêm disposições que constituem fundamento para este procedimento. As edições indicadas estavam em vigor no momento desta publicação. Como toda norma está sujeita a revisões e alterações, aqueles que realizam procedimentos com base nesta devem verificar a existência de legislação superveniente aplicável ou de edições mais recentes das normas citadas.

Na aplicação desta norma sugere-se consultar:

- USEPA. Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water. Criteria and procedures. Quality Assurance. 5th Edition. EPA 815-R-005-04. January 2005. Disponível em: http://www.epa.gov/ogwdw/methods/pdfs/manual_labcertification.pdf. Acesso em 21/11/2012.
- United States Environmental Agency. Environmental Regulations and Technology. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. EPA/625/r-92/013. Cincinnati, 2003.

4 Materiais

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balanças

As balanças devem ser instaladas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura. Calibrações periódicas devem ser efetuadas, bem como verificações da balança com massas de referência.

4.1.1.1 Balança de topo

É utilizada para pesar quantidades superiores ou iguais a 2 g. Deve ter sensibilidade de, no mínimo, 0,1g ao serem pesados 150 g.

4.1.1.2 Balança analítica

É utilizada para pesar quantidades inferiores a 2 g. Deve ter sensibilidade de, no mínimo, 1 mg ao serem pesados 10 g.

4.1.1.3 Balança determinadora de umidade

Deve ter capacidade máxima de 35 g, resolução de 1 mg em pesagem e 0,01% de umidade relativa, repetitividade de 0,2% com 1 g de amostra e de 0,05% com 5 g de amostra e faixa de temperatura de 40 a 160°C, com ajuste de 1°C. Deve apresentar método de determinação de tempo automático ou por definição de tempo para análise de 0,1 a 99 minutos e resultados em porcentagem de umidade/g e porcentagem de sólidos totais/g.

4.1.2 Destilador ou purificador de água

Deve produzir água que obedeça aos critérios de qualidade estabelecidos pela Agência Ambiental Americana (USEPA 2005).

4.1.3 Equipamentos para esterilização

4.1.3.1 Autoclave

Deve ter a capacidade suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado. Deve manter a temperatura de esterilização de 121°C durante o ciclo, o qual não deve exceder 45 minutos para um tempo de esterilização de 15 minutos.

Nota: As autoclaves que possuem portas deslizantes, com abertura e fechamento automáticos, ciclos programáveis de esterilização e monitoramento contínuo de temperatura e pressão também podem apresentar etapas de resfriamento e remoção do vapor como parte do ciclo; para esses equipamentos, não é requerido o tempo estrito de 45 minutos para o ciclo, desde que os registros impressos indiquem a operação do ciclo normal e o resfriamento durante a exaustão e remoção do vapor.

4.1.3.2 Estufa para esterilização

Deve manter a temperatura de 170 a 180°C durante o período de esterilização (mínimo de duas horas). O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que 10°C, com o seu bulbo ou sensor colocado na areia, durante o uso.

4.1.4 Incubadora bacteriológica (26°C)

Deve manter a temperatura uniforme na faixa requerida ($26 \pm 1,0^\circ\text{C}$). O termômetro utilizado para o controle de temperatura da incubadora deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que 1,0°C e estar imerso em líquido.

4.1.5 Banho-maria 60°C equipado com termostato e agitador de baixa velocidade para promover circulação da água e manter a temperatura uniforme ($60,0^\circ\pm 1,0^\circ\text{C}$) em todos os pontos. O termômetro utilizado para controle do banho-maria deve ter a escala graduada em incrementos de 1,0°C ou menos.

4.1.6 Potenciômetro

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH. Sua padronização deve ser feita antes de cada período de uso com duas soluções - tampão padrões (Exemplo: pH = 6,86 e pH = 4,0 ou pH = 9,18) de acordo com o pH do meio de cultura ou solução que estiver sendo preparada.

4.1.7 Agitador de tubos tipo Vortex

4.1.8 Homogeneizador de amostras (“Blender”)

Homogeneizador (blender) com duas velocidades (18000 rpm e 22000 rpm) com capacidade para 1 litro de amostra com copo, alça e tampa em aço inoxidável autoclavável, para uso em laboratório.

4.1.9 Bomba de vácuo e compressor de ar com sistema de palhetas rotativas lubrificadas a óleo que produza alternadamente vácuo ou ar comprimido conforme a necessidade do usuário ou linha de pressão e vácuo com capacidade mínima de 5 Bar.

4.1.10 Refrigerador

Deve manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C e ter a capacidade adequada para armazenar meios de cultura, reagentes, soluções ou amostras que necessitam de refrigeração. O termômetro utilizado para o controle da temperatura deve ter graduação ou resolução igual ou menor que 1°C e estar imerso em líquido.

4.1.11 Centrífuga capaz de proporcionar força de 800 a 1000 g, equipada com rotores “swinging-bucket”, que acomodem tubos cônicos de 50 mL e 15 mL.

4.1.12 Microscópio óptico de campo claro e preferencialmente com contraste de fase ou contraste diferencial e objetivas de 10x e 20x.

4.1.13 Agitador magnético

Deve possuir plataforma com aproximadamente 19 cm de diâmetro; controle eletrônico de velocidade de agitação entre 50 e 1300 rpm; capacidade para agitar até 10 litros de líquidos com viscosidade próxima à da água.

4.2 Vidraria e materiais plásticos

4.2.1 Béqueres do tipo Berzelius de 1 L

Béquer de forma alta, graduado, em vidro borossilicato e neutro, com capacidade para conter 1 L.

4.2.2 Béquer do tipo Griffin, com capacidade para 2 L

Béquer de forma baixa, graduado, em vidro borossilicato e neutro, com capacidade para conter 2000 mL.

4.2.3 Frasco para coleta de amostra

Pote para coleta, boca larga, 1000 mL, cilíndrico em polietileno.

4.2.4 Provetas de 100 e 1000 mL

De vidro borossilicato neutro, graduadas (100 e 1000 mL), com erro volumétrico inferior a 2,5%.

4.2.5 Pipetas

Tipo Mohr, para 10 mL e 5 mL, com graduação de 1/10, erro de calibração inferior a 2,5%, com bocal para tampão de algodão. Podem ser utilizadas pipetas descartáveis de plástico estéreis ou de vidro borossilicato neutro.

4.2.6 Tubos cônicos de centrífuga

Em polipropileno, graduado, com capacidade para 50 mL, estéril e descartável, com tampa de rosca.

4.2.7 Funil de vidro

Em vidro borossilicato e neutro, corpo liso, diâmetro da boca de 80 mm com a haste curta.

4.2.8 Frascos de vidro de 25 mL

Frascos de vidro em borossilicato e neutro, com tampa de rosca, capacidade aproximada de 25 mL.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Peneiras de malha 50 e 400 mesh

Peneiras granulométricas, redondas, com diâmetro de 5 polegadas e altura de 2 polegadas, (5 x 2), aro em aço inoxidável autoclavável e abertura (mesh) de 50 e 400 que correspondem respectivamente a 0,297 mm e 0,037 mm.

4.3.2 Pipetadores automáticos de 10 a 100 µL e 200 a 1000 µL.

4.3.3 Ponteiras de polipropileno estéreis compatíveis com os pipetadores automáticos.

4.3.4 Barra magnética

Barra magnética revestida de teflon medindo aproximadamente 40 x 8 mm com superfície lisa arredondada.

4.3.5 Câmara de Sedgwick-Rafter

Câmara de Sedgwick Rafter, para contagem, confeccionada em vidro com dimensões de 50 x 20 x 1 mm, para contagem de partículas e microrganismos em 1 mL de água e outros líquidos transparentes.

4.3.6 Câmara de Neubauer

Lâmina de vidro, retangular e mais alta que as normais, com uma depressão no centro, possuindo marcações de quadrantes em medidas conhecidas. São utilizadas para fazer contagens de células e microrganismos.

4.3.7 Densímetro

Densímetro de massa específica 1,000/1,500:0,005 para uso geral em laboratórios e indústrias.

4.3.8 Termômetros

Os termômetros eletrônicos digitais devem apresentar faixa de medição, resolução, exatidão e precisão adequadas ao uso. Todos os termômetros devem ser calibrados periodicamente e a correção da temperatura deve ser efetuada, quando aplicável.

Nota: Não se recomenda a utilização de termômetros de vidro contendo mercúrio.

4.4 Suspensão de ovos férteis de *Ascaris suum*, disponível comercialmente

Suspensão contendo aproximadamente 2,5 milhões de ovos férteis de *Ascaris suum* para utilização nos controles da análise.

5 Reagentes e soluções

Nota: A água purificada utilizada no preparo dos reagentes é água tratada pelo processo de osmose reversa

5.1 Solução de formalina 0,5%

5.1.1 Fórmula:

- Formalina (formaldeído 40%).....5,0 mL
- Água purificada.....995,0 mL

5.1.2 Preparo

Misturar a formalina e a água purificada e agitar bem até a completa mistura. Colocar em frasco de 1 L com tampa de rosca.

5.1.3 Armazenamento

Temperatura ambiente (inferior a 30°C) no máximo durante dois dias.

5.2 Hidróxido de sódio 1 N

5.2.1 Fórmula:

- Hidróxido de sódio.....40,0 g
- Água purificada.....1000 mL

5.2.3 Preparo:

Pesar 40 g de hidróxido de sódio e colocar em um béquer. Dissolver o NaOH em 500 mL de água purificada e transferir para um balão volumétrico. Completar o volume para 1000 mL com água purificada. O preparo dessa solução gera grande quantidade de calor. Portanto, deve ser tomada precaução especial com o aquecimento do béquer e do balão volumétrico. Colocar em frasco âmbar ou protegido da luz com tampa rosqueada de capacidade para 1000 mL.

5.2.4 Armazenamento

Temperatura ambiente (inferior a 30°C) no máximo durante seis meses.

5.3 Solução de detergente 7X 0,1%

5.3.1 Fórmula:

- Detergente 7X.....5,0 mL
- Tampão fosfato.....4995,0 mL

5.3.2 Preparo:

Misturar o detergente 7X e o tampão fosfato e agitar bem até a completa homogeneização. Ajustar o pH para $7,2 \pm 0,1$ com NaOH 1 N. Colocar em frasco plástico com tampa rosqueada de capacidade para 5 L.

5.3.3 Armazenamento

Temperatura ambiente (inferior a 30°C), no máximo durante 30 dias.

5.4 Sulfato de magnésio gravidade específica 1,20

5.4.1 Fórmula:

- Sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).....441,6 g
- Água purificada.....1000,0 mL

5.4.2 Preparo:

Pesar o sulfato de magnésio e acrescentar 1000 mL de água purificada. Agitar bem até a completa dissolução do sal. Após a dissolução e usando um densímetro calibrado, verificar a gravidade específica que deverá ser 1,20. Caso não seja obtido esse valor, corrigir com sulfato de magnésio ou água purificada. Após o preparo filtrar a solução em membrana de acetato de celulose (ou acetato e nitrato de celulose) de 0,45 μm de porosidade. Colocar em frascos com tampa rosqueada estéril de capacidade de 1 L.

5.4.3 Armazenamento

Temperatura ambiente (inferior a 30 °C), no máximo durante seis meses.

5.5 Tampão fosfato

5.5.1 Fórmula:

- Dihidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4).....34,0 g
- Água purificada.....1000,0 mL

5.5.2 Preparo:

Pesar o dihidrogeno fosfato de potássio e colocar em um balão volumétrico, acrescentar 1000 mL de água purificada e agitar bem até a completa dissolução do sal. Ajustar o pH para $7,2 \pm 0,5$ com NaOH

1 N. Colocar em frascos com tampa rosqueada de capacidade de 1 L.

5.5.3 Armazenamento

Temperatura ambiente (inferior a 30 °C) no máximo durante 30 dias.

6 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas na publicação da Agência Ambiental Americana (USEPA 2003).

7 Execução do ensaio

7.1 Princípio do método

A técnica descrita neste procedimento é baseada na separação dos ovos de helmintos das demais partículas de mesma dimensão e maior peso presentes no esgoto por meio de flotação com solução de sulfato de magnésio de gravidade específica 1,20. Antes da flotação, são realizadas etapas de sedimentação e centrifugação, e após a flotação, passagem através de peneira de malha específica para retenção dos ovos de *Ascaris spp* e centrifugação.

Após essas etapas, o sedimento obtido é ressuspenso em solução de formalina 0,5% e incubado a 26°C durante três a quatro semanas. Após esse período os ovos são contados e classificados como viáveis e não-viáveis.

7.2 Procedimento (Figura 1; Figura 2)

7.2.1 Identificar adequadamente a amostra, registrando informações da procedência, data e hora da coleta, bem como dados da análise (data de início da análise, massa analisada, números dos lotes dos reagentes e das soluções utilizadas);

7.2.2 Determinar a porcentagem estimada da umidade da amostra utilizando a balança determinadora de umidade (**item 4.1.1.3**);

7.2.3 Pesar uma quantidade do lodo de esgoto equivalente a 10 g de sólidos totais, calculados com base no teor de umidade estimado;

7.2.4 Transferir a amostra pesada para um béquer de 1 L, previamente identificado com o número da amostra e adicionar água purificada em volume suficiente para permitir uma boa homogeneização da amostra, que deve ser realizada com um bastão de vidro ou madeira. Após homogeneização, completar o volume com água purificada até 400 mL e deixar em repouso no mínimo quatro horas ou "overnight" a temperatura de 4°-10°C;

7.2.5 Transferir a amostra para um homogeneizador (blender) e homogeneizar em velocidade baixa durante um minuto. Dividir a amostra homogeneizada em quatro béqueres, com capacidade para 1 L, e usando uma pissete com água purificada, lavar completamente o homogeneizador transferindo a água de lavagem para os respectivos béqueres;

Nota: Repetir os procedimentos descritos nos itens abaixo para cada um dos quatro béqueres.

7.2.6 Completar o volume para 900 mL com solução de detergente 7X 0,1% e deixar a amostra sedimentar no mínimo por/durante quatro horas ou "overnight" a temperatura de 4 – 10°C. Mexer ocasionalmente, se necessário, com bastão de vidro ou madeira, para certificar-se que todo material flotado na superfície sedimente. Pode-se adicionar mais solução de detergente 7X 0,1% e homogeneizar a mistura, caso seja necessário;

7.2.7 Após a sedimentação, aspirar a vácuo o sobrenadante acima da camada de sólidos. Transferir o sedimento para o homogeneizador (blender) e completar com água purificada até aproximadamente a metade do copo do homogeneizador (cerca de 400 mL). Homogeneizar novamente durante um minuto em baixa velocidade;

7.2.8 Transferir o homogeneizado para o béquer de origem, lavando o copo do homogeneizador com a solução de detergente 7X 0,1% e completar o volume para 900 mL. Deixar sedimentar no mínimo quatro horas ou “overnight” à temperatura de 4 - 10°C. Aspirar a vácuo o sobrenadante acima da camada de sólidos;

7.2.9 Completar cada béquer para 300 mL com solução de detergente 7X 0,1% e homogeneizar durante cinco minutos com agitador magnético. Utilizando uma peneira de 50 mesh, peneirar a amostra homogeneizada para um béquer com capacidade para 2 L. Lavar bem a amostra através da peneira com uma pissete contendo detergente 7X 0,1%;

Nota: Nesta etapa pode-se peneirar a amostra contida nos quatro béqueres para um único béquer e prosseguir com a análise;

7.2.10 Deixar sedimentar por/durante no mínimo quatro horas ou “overnight” à temperatura de 4 – 10°C;

7.2.11 Aspirar a vácuo o sobrenadante acima da camada de sólidos. Misturar o sedimento e distribuir igualmente em tubos de centrifuga cônicos, graduados com capacidade para 50 mL. Lavar completamente qualquer sedimento do béquer para dentro dos tubos, utilizando uma pissete com água purificada. Completar o volume dos tubos para 40 mL. Centrifugar a 1000 g por 10 minutos e decantar o sobrenadante vertendo os tubos com cuidado para não desprender o sedimento (o sedimento em cada tubo não deverá exceder 5 mL). Se esse volume for excedido, adicionar água purificada, homogeneizar e distribuir o volume igualmente entre tubos adicionais, repetindo centrifugação e a decantação;

7.2.12 Adicionar 10 a 15 mL de uma solução de sulfato de magnésio gravidade específica 1,20, em cada tubo e homogeneizar 15 a 20 segundos em Vortex;

7.2.13 Adicionar mais solução de sulfato de magnésio gravidade específica 1,20 em cada tubo para levar o volume para 40 mL. Homogeneizar e centrifugar durante 5 a 10 minutos a 1000 g, sem utilizar o freio;

7.2.14 Umedecer uma peneira de 400 mesh com água purificada e então passar 25 a 35 mL do sobrenadante de cada tubo pela peneira colocada sobre um béquer de forma alta;

7.2.15 Com uma pissete contendo água purificada, lavar o excesso de fluido de flotação e as partículas finas através da peneira;

7.2.16 Enxaguar o sedimento coletado na peneira, com o auxílio de um funil de vidro, para dentro de um tubo de centrifuga cônico de 50 mL mediante o direcionamento do jato de água da pissete para a parte superior da peneira, lavar também a parte inferior da peneira com o jato de água da pissete e recolher estas águas de lavagem no tubo. Usualmente de cada amostra obtém-se um tubo com 50 mL.

7.2.17 Centrifugar o tubo durante cinco minutos a 1000 g, e aspirar o sobrenadante acima dos sólidos

Nota: Se mais de um tubo tiver sido utilizado por amostra, transferir os sedimentos para um único tubo, adicionar água e centrifugar novamente;

7.2.18 Ressuspender o sedimento em 2 mL de solução de formalina 0,5% e colocar em frascos com tampa de rosca com capacidade para 25 mL, mantendo as tampas parcialmente abertas. Lavar o tubo com mais 2 mL de solução de formalina 0,5% e adicionar ao frasco. Marcar o nível de líquido de cada

frasco com auxílio de uma caneta apropriada.

7.3 Preparo dos controles positivo e negativo

7.3.1 Controle negativo

Adicionar 50 µL da suspensão estoque de ovos férteis de *Ascaris suum* (item 4.4) em 4 mL de solução de formalina 0,5% no frasco de tampa de rosca e aquecer essa suspensão de ovos a 60°C durante 15 minutos.

7.3.2 Controle positivo

Colocar em frasco de tampa de rosca 50 µL da suspensão de ovos férteis de *Ascaris suum* em 4 mL de solução de formalina 0,5%.

7.4 Incubação

7.4.1 Incubar os frascos das amostras e dos controles com as tampas parcialmente abertas durante três a quatro semanas a 26[±]1°C;

7.4.2 Verificar diariamente o nível de líquido de cada frasco e quando necessário adicionar água purificada para compensar a evaporação.

7.5 Exame microscópico

7.5.1 A partir da 3ª semana, suspender o sedimento do frasco controle positivo e retirar uma pequena quantidade da suspensão para exame em microscópio. Repetir esse procedimento a cada dois ou três dias. Quando a maior parte (80%) dos ovos de *Ascaris suum* do frasco controle positivo estiverem completamente embrionados, as amostras estarão prontas para leitura.

7.5.2 Examinar os concentrados no microscópio, com objetiva de 10 ou 20x, utilizando uma câmara de "Sedgwick-Rafter" para contar os ovos detectados. Classificar os ovos como embrionados ou não. Em alguns ovos de *Ascaris* sp embrionados pode-se observar os movimentos da larva (**Figura 3**).

7.6 Cálculo e expressão dos resultados

Calcular o número de ovos viáveis de *Ascaris* spp por grama de sólidos totais por meio da expressão:

$$n = \frac{\text{ovos viáveis de } \textit{Ascaris} \text{ spp}}{\text{g de ST analisados}}$$

Onde:

n = número de ovos viáveis de *Ascaris* spp por grama de sólidos totais

ST = sólidos totais

8 Controle de qualidade

8.1 Precisão e exatidão

8.1.1 Coletar uma amostra de lodo de esgoto na qual ovos viáveis de *Ascaris* spp estejam ausentes ou presentes em baixas densidades;

8.1.2 Pesar três alíquotas equivalentes a 10 g/ST cada. Realizar a análise de ovos viáveis de *Ascaris* spp, conforme descrito no **item 7.2** em duas partes da amostra para determinação da precisão;

8.1.3. Na terceira alíquota da amostra adicionar uma suspensão de ovos férteis de *Ascaris suum* contendo aproximadamente 100 ovos férteis, preparada conforme descrito nos **itens 8.1.3.1 a 8.1.3.3**;

8.1.3.1 Homogeneizar a suspensão estoque de ovos férteis de *Ascaris suum*;

8.1.3.2 Contar 10 alíquotas de 0,05 mL em câmara de Sedgwick –Rafter ou Neubauer. Contar os ovos férteis e inférteis e calcular o número de ovos férteis por mL da suspensão estoque;

8.1.3.3 Calcular o volume em mL de suspensão estoque que deve ser adicionado à 3ª alíquota da amostra de lodo, para fornecer 100 ovos férteis de *Ascaris suum*.

8.1.3.4 Adicionar o volume calculado na amostra de lodo de esgoto (**item 7.2.4**) e analisar conforme descrito no **item 7.2**;

8.1.4 Cálculo da precisão:

$$Pr = \frac{DPm}{Mn}$$

Onde:

Pr = precisão

DPm = desvio padrão da média do número de ovos viáveis de *Ascaris* spp obtido na contagem das duas alíquotas da amostra

Mn = média do número de ovos viáveis de *Ascaris* spp das duas alíquotas da amostra

8.1.5 Cálculo da exatidão

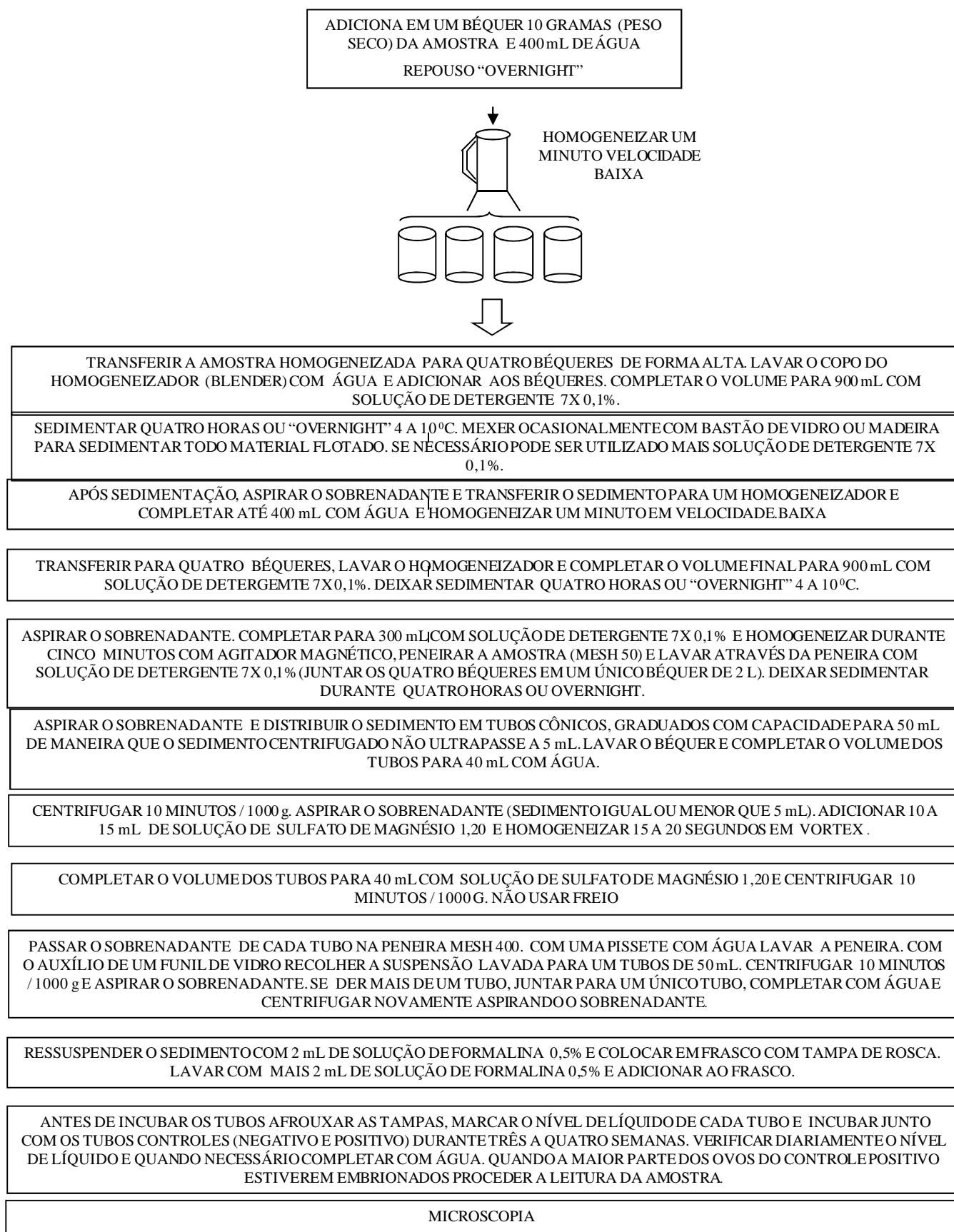
$$R (\%) = \frac{Nr - M}{100} \times 100$$

Onde:

Nr = número de ovos viáveis de *Ascaris* spp contados na amostra contaminada

M = média do número de ovos viáveis de *Ascaris* spp das duas alíquotas da amostra

Figura 1 – Esquema de procedimento para determinação de ovos viáveis de *Ascaris* spp pela técnica de centrífugo-flutuação em amostras de lodo de esgoto



Fonte: CETESB, 2012.

Figura 2 – Esquema de procedimento para determinação de ovos viáveis de *Ascaris spp* pela técnica de centrífugo-flutuação em amostras de lodo de esgoto



Pesar, hidratar

Homogeneizar

Dividir em 4 béqueres

Adicionar
detergente 7x 0,1%

Incubar



Aspirar o sobrenadante-

Homogeneizar

Adicionar detergente
7X 0,1%

Incubar

Aspirar o sobrenadante



Homogeneizar

Lavar peneira

Incubar

Aspirar

Adicionar em
tubos/Centrifugar



Aspirar o sobrenante

Flotar com sulfato de
magnésio

Centrifugar e peneirar

Reservar o filtrado

Centrifugar/Transferir
para frasco com
tampa de
rosca/Incubar

Fonte: CETESB, 2012

Figura 3 – Ovos típicos de *Ascaris spp* isolados de amostras ambientais

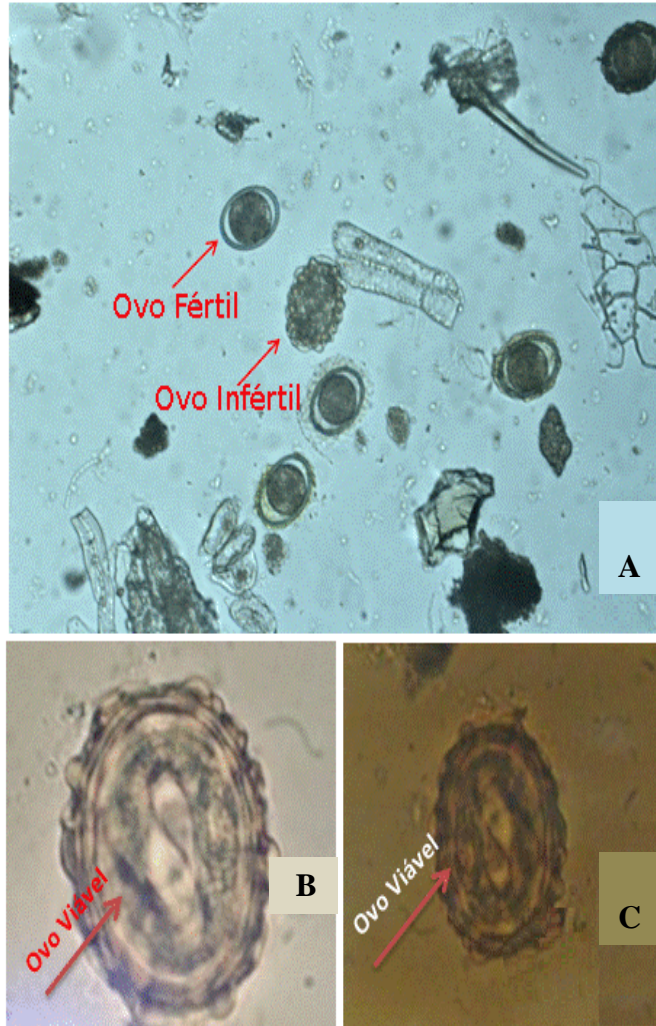


Figura A – Ovos férteis e inférteis de *Ascaris spp*
Figuras B e C – Ovos viáveis (embrionados) de *Ascaris spp*

Fonte: CETESB, 2012

9 Referências

Albonico, M.; Montresor, A.; Crompton, D.W.T.; Savioli, L. Intervention for the control of soil-transmitted helminthiasis in the community. **Advances in Parasitology**, London, GB, v. 61, p. 311-348, June 2006.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, n. 167, 30 ago. 2006. Seção 1, p. 141-146. Disponível em:

<<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=506>>. Acesso em: jul. 2013.

CVE . Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Manual das doenças transmitidas por alimentos e água: microorganismos patogênicos/doenças: *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*. **Informe NET DTA**: informações sobre doenças transmitidas por água e alimentos, São Paulo, 2001. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/ascaristrichuris.htm>>. Acesso: 5 fev. 2013.

CROMPTON , D.W.T. Gastrointestinal nematodes – Ascaris, Hookworm, Trichuris and Enterobius. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (Ed.). Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 9th ed. London, GB: Arnold, 1998. v. 5: Parasitology, part 3, chap. 29, p. 561-584. Edited by Cox, F.E.G.; Kreier, J.P. and Wakelin, D.

CROMPTON, D.W.T. Ascaris and ascariasis. *Advances in Parasitology*, London, GB, v. 48, p. 285-375, 2001.

HOTEZ, P. J. et al. Soil transmitted helminth infections: the nature, causes and burden of the condition. Bethesda, Maryland: Fogarty International Center - National Institutes of Health, 2003. (DCPP - Disease Control Priorities Project, Working Paper Series, n. 3). Disponível em: <<http://www.dcp2.org/file/19/>>. Acesso em: jun. 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Biosolids applied to land: advancing standards and practices. Washington, DC: The National Academies, 2002. Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10426>. Acesso em: jun. 2013.

Prüss-Üstün, A.; Bos, R.; Gore, F.; Batram, J. **Safer water, better health**: costs, benefits and sustainability of intervention to protect and promote health. World Health Organization, Geneva, 2008. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596435_eng.pdf>. Acesso em: jun. 2013

United States Environmental Protection Agency. **A plain English guide to the EPA 503 part biosolids rule**. Washington , 1994. Disponível em [http://water.epa.gov/scitech/wastetech/biosolids/503pe_index.cfm]. Data de acesso: 22/04/2013.

United States Environmental Protection Agency. **Environmental Regulations and Technology. Control of pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge**. EPA/625/r-92/013. Cincinnati, 2003. Disponível em: <<http://www.epa.gov/nrmrl/pubs/625r92013/625R92013.pdf>>. Acesso em: jun. 2013

United States Environmental Protection Agency **Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water**: criteria and procedures quality assurance. 5th ed. Cincinnati, OH, 2005. (EPA 815/R-005/04). Disponível em: <http://www.epa.gov/ogwdw/methods/pdfs/manual_labcertification.pdf>. Acesso em: jun. 2013.

World Health Organization. **Integrated Guide to Sanitary Parasitology**. Amman, Jordan, 2004. Disponível em <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd65/SanitaryParasitology_Guide.pdf> Data de acesso: 22/04/2013.