

FLAVIANE CRISTINA LOPES MATOSINHOS

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
DETECÇÃO DE OVOS E LARVAS DE HELMINTOS
EM ALFACE**

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Parasitologia

Belo Horizonte, MG - Brasil

2012

FLAVIANE CRISTINA LOPES MATOSINHOS

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
DETECÇÃO DE OVOS E LARVAS DE HELMINTOS
EM ALFACE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Élide Mara Leite Rabelo

Coorientação: Dr.^a Virginia Del Carmen Troncoso Valenzuela

Belo Horizonte

2012

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Parasitologia Molecular, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em parceria com o Serviço de Microscopia de Produtos do Instituto Otávio Magalhães da Fundação Ezequiel Dias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pelo dom da vida e pelas oportunidades nela concedida.

À minha família pelo incentivo, carinho e compreensão, já que por muitas vezes me privei da companhia deles.

À Virgínia Del Carmen, minha chefe e coorientadora, por ter acreditado na minha capacidade e pela oportunidade. Agradeço ainda pelo incentivo e ajuda constantes.

À equipe do Serviço de Microscopia de Produtos da Funed pelo incentivo, apoio, carinho e principalmente amizade, visto que sem esta ajuda não seria possível concluir tal etapa. Vocês redistribuíram minhas tarefas de serviço, auxiliaram-me em tudo o que foi possível, e como sempre me encheram de prazer em trabalhar, com a rotineira alegria e amizade desta grande equipe. Agradeço também à Marta Alves, estagiária que me ajudou na execução dos experimentos.

À Professora Dr^a. Elida Rabelo que me acolheu em seu laboratório, agradeço pela orientação, pelos ensinamentos e amizade.

Às companheiras do Laboratório de Parasitologia Molecular pela ajuda constante, pelos ensinamentos, pelos conselhos e também amizade. Foi um prazer conviver com vocês.

Ao Professor Ricardo Toshio Fujiwara pelos ensinamentos e aconselhamentos.

À Professora Mariângela Carneiro que, gentilmente, aceitou ser relatora desta dissertação.

À Maria Helena Martini, Prof^a. Joziana Muniz de Paiva Barçante, Thales Augusto Barçante e Prof^a. Adriana Oliveira Costa que, cordialmente, colaboraram realizando as análises interlaboratoriais.

À Joziana Muniz de Paiva Barçante e aos Professores Alan Lane de Melo e Walter dos Santos Lima que, gentilmente, cederam materiais biológicos para este trabalho.

Aos colegas da turma de Mestrado pelos momentos de aprendizagem e de desconcentração.

A todos meus amigos e colegas que torceram por mim e tiveram paciência com minhas reclamações. A vocês também peço desculpas pelas muitas ausências.

À Fundação Ezequiel Dias que me liberou de algumas horas de trabalho, viabilizando esta pós-graduação. E à FAPEMIG, que em parceria com aquela, concedeu-me uma bolsa parcial como incentivo ao estudo.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma colaboraram, seja profissionalmente ou amistosamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

Globalização no comércio de alimentos, facilidade das viagens internacionais e aumento do número de indivíduos imunocomprometidos são alguns dos fatores atribuídos ao aumento das infecções parasitárias de origem alimentar. As metodologias descritas para avaliar a contaminação por helmintos e protozoários em vegetais são derivadas de métodos sabidamente eficazes para outras matrizes, como água e fezes, mas que não apresentam estudos sobre o desempenho dos mesmos quando adaptados para vegetais. O método preconizado pelo FDA (Food and Drug Administration) apresenta um percentual de recuperação de apenas 10% para ovos de *Ascaris* sp ou *Trichuris* sp. Em função desses fatos, o estudo aqui proposto busca maior conhecimento sobre o diagnóstico de contaminantes parasitários, tendo como objetivo padronizar um método de detecção de ovos e larvas de helmintos em alface, estimando sua porcentagem de recuperação. Alfaces previamente higienizadas foram contaminadas, artificialmente e em diferentes níveis, com ovos de *Ascaris suum* e de ancilostomídeos, e larvas de *Ancylostoma ceylanicum*. Para a padronização do método, foram testados: líquidos extratores, etapas de lavagem da hortaliça e tempo de sedimentação espontânea. Maiores porcentagens de recuperação de ovos e larvas foram obtidas usando a glicina 1M como líquido extrator, agitação manual por 3 minutos e sedimentação de 2 horas. Seguindo essas condições padronizadas, foram realizadas dez repetições para cada um dos cinco níveis de contaminação artificial (n=50), obtendo-se média de recuperação de 62,6% ($\pm 20,2$) para ovos de *A. suum*, 51,9% ($\pm 20,0$) para ovos de ancilostomídeos e 50,0% ($\pm 27,3$) para larvas de *A. ceylanicum*. Visando testar o desempenho do método, também foram realizadas análises com outro tipo de matriz e análises interlaboratoriais, com resultados também satisfatórios. Para identificação complementar dos parasitos, foi testada, com sucesso, uma reação em cadeia da polimerase (PCR) partindo-se diretamente do ovo, sem extração prévia de DNA seguida da técnica de PCR-RFLP (polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição), a qual possibilita a identificação específica do material amplificado. O método de identificação de ovos e larvas de helmintos proposto neste trabalho se mostrou de fácil execução, com etapas mais simples de extração e concentração de

parasitos que alguns dos procedimentos já publicados, o que aumenta sua potencial contribuição em ações de vigilância sanitária e epidemiológica.

ABSTRACT

Globalization of food trade, ease of international travel and increasing numbers of immunocompromised individuals are some of the factors attributed to the increase of food-borne parasitic infections. The methods described to assess contamination by helminths and protozoa in plants are derived from known effective methods for other matrices such as water and feces, but without presenting fundamental studies on their performance when adapted for vegetables. The method recommended by the FDA (Food and Drug Administration) has a recovery rate of only 10% for eggs of *Ascaris* sp and *Trichuris* sp. Given these facts, the study proposed here seeks to improve the knowledge about the diagnosis of parasitic contaminants, aiming to standardize a method for detecting helminth eggs and larvae in lettuce, estimating their percentage of recovery. Previously sanitized lettuces were artificially contaminated at different levels, with eggs of *Ascaris suum* and hookworms, and larvae of *Ancylostoma ceylanicum*. To standardize the method, were tested: liquid extractors, vegetable washing steps and time to spontaneous sedimentation. Higher percentages of recovery of eggs and larvae were obtained using 1M glycine as liquid extractor, manual shaking for 3 minutes and 2 hours of sedimentation. Following these standard conditions, there were ten replicates for each of the five levels of artificial contamination (n = 50), yielding an average recovery of 62.6% (\pm 20.2) for eggs of *A. suum*, 51.9% (\pm 20.0) eggs from hookworms and 50.0% (\pm 27.3) for larvae of *A. ceylanicum*. In order to test the performance of the method, tests were also performed with another type of matrix and collaborative analytical studies by different laboratories, with satisfactory results. For additional identification of parasites a polymerase chain reaction (PCR) was tested successfully, starting directly from the egg, without prior extraction of DNA followed by PCR-RFLP (polymorphism by restriction fragment length), which enables the specific identification of the amplified material. The method of identification of helminth eggs and larvae proposed in this study proved to be simpler and more efficient in comparison to procedures previously published, which increases their potential contribution to health surveillance and epidemiological studies.

LISTA DE ABREVIATURAS

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BLAST – Basic local alignment search tool

C- – controle negativo

C+ – controle positivo

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo 5' fosfato

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

FDA - Food and Drug Administration

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

ITS – Internal transcribed spacer (espaço transcrito interno)

ITS-1 – Internal transcribed spacer 1 (primeiro espaço transcrito interno)

ITS-2 – Internal transcribed spacer 2 (segundo espaço transcrito interno)

KCl – Cloreto de potássio

Kg – quilograma

M – molar

mg - miligrama

MG – Minas Gerais

MgCl_2 – cloreto de magnésio

mL – mililitro

mM – milimolar

NaOH – hidróxido de sódio

NCBI – National Center for Biotechnology

ng – nanograma

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase

PM – Peso molecular

PR – Paraná, Brasil

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

RFLP – Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição)

RNA – ácido ribonucléico

RNase – Ribonuclease

RS – Rio Grande do Sul, Brasil

TAE - Tris-base 0,04M, EDTA 0,001M pH 8, ácido acético glacial

Taq – *Thermophilus aquaticus*

TBE – Tampão tris-borato

Tris – Hydroximetil amino metano

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UV – luz ultra violeta

V - Volts

X-GAL – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema representativo da unidade repetitiva do rDNA de eucariotos.....15
- Figura 2:** Recuperação de ovos de ancilostomídeos e *Ascaris suum*, e de larvas de *Ancylostoma ceylanicum* para os modos de agitação avaliados, após contaminação artificial das amostras de alface.....39
- Figura 3:** Dispersão, por nível de contaminação artificial, dos resultados de recuperação de ovos e larvas para o método de detecção proposto.....43
- Figura 4:** Contaminantes não parasitários presentes em amostra de rúcula. (A) inseto inteiro (100x); (B) fragmento de inseto (200x); (C) rotífero (400x).....49
- Figura 5:** Comparação entre os percentuais médios de recuperação de ovos de *A. suum*, ovos de ancilostomídeos e de larvas de *A. ceylanicum* obtidos pelo método proposto quando empregado para amostras de alface e de rúcula.....50
- Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 1% apresentando os resultados da PCR para pequena quantidade de ovos de *Ancylostoma caninum*. PM: Padrão molecular 1kb (Fermentas); C+: Mini-prep de *A. caninum*; Linhas 1-5 representam, respectivamente: 4, 3, 7, 9 e 10 ovos de *A. caninum*; C-: controle negativo.....51
- Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose 1% apresentando os resultados da PCR de colônias provenientes de transformações com plasmídeos recombinantes contendo material genético contaminante que foi amplificado. PM: 1kb (Fermentas); DNA contaminante amplificado das colônias 30 e 48.....52
- Figura 8:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% do RFLP da região ITS com a enzima *Hinf*- I para diferenciar ancilostomídeos e fungo contaminante. PM: 1kb (Fermentas); 1- DNA de *A. caninum* sem digerir (850pb); 2- DNA de *A. caninum* digerido; 3- DNA de fungo contaminante sem digerir (600pb); 4- DNA de fungo

contaminante digerido; 5- DNA de ambos sem digerir; 6- DNA de ambos digerido;
PM: 100pb (Fermentas).....53

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Descrição das etapas-chave de diferentes métodos de detecção de parasitos em vegetais.....	12
Quadro 2: Número aproximado de ovos e larvas presentes em cada nível de contaminação artificial.....	27
Tabela 1: Resultado das contagens em lâminas de ovos e larvas, e concentração média final, por tipo de contaminante.....	36
Tabela 2: Avaliação de desempenho de líquidos extratores, após contaminação artificial das amostras de alface.....	37
Tabela 3: Avaliação de desempenho de água destilada e solução de glicina 1M como líquidos extratores, após contaminação artificial das amostras de alface.....	38
Tabela 4: Avaliação de desempenho de diferentes intervalos de sedimentação, após contaminação artificial das amostras de alface.....	40
Tabela 5: Percentual médio de recuperação de ovos e larvas do método de detecção proposto. Resultados dos diferentes níveis de contaminação artificial avaliados.....	42
Tabela 6: Percentuais de recuperação de ovos de <i>Ascaris suum</i> obtidos pelos laboratórios colaboradores, após contaminação artificial das amostras de alface.....	45
Tabela 7: Percentuais de recuperação de ovos de ancilostomídeos, obtidos pelos laboratórios colaboradores, após contaminação artificial das amostras de alface.....	46
Tabela 8: Percentuais de recuperação de larvas de <i>Ancylostoma ceylanicum</i> , obtidos pelos laboratórios colaboradores, após contaminação artificial das amostras de alface.....	47

Tabela 9: Percentuais médios de recuperação de ovos e larvas em amostras de rúcula, após contaminação artificial.....48

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE QUADROS E TABELAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Situação das helmintíases no mundo.....	3
1.2. Contaminações de hortaliças por patógenos de origem fecal	5
1.3. Ocorrência de enteroparasitos em hortaliças	8
1.4. Métodos de detecção de parasitos em vegetais.....	10
1.5. Identificação molecular de parasitos	15
1.6. Controle sanitário de hortaliças	16
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. METODOLOGIA	23
4.1. Obtenção dos parasitos para contaminação artificial	23
4.2. Amostras de alface	24
4.3. Contaminação artificial das amostras.....	25
4.4. Extração e concentração das formas parasitárias	25
4.5. Análise microscópica.....	27
4.6. Determinação do percentual de recuperação do método proposto	27
4.7. Análises interlaboratoriais	28

4.8. Aplicação do método proposto a outra matriz	28
4.9. Análise de dados.....	29
4.10. Identificação molecular.....	29
4.11. Clonagem e sequenciamento	31
5. RESULTADOS	36
5.1. Parasitos utilizados na contaminação artificial	36
5.2. Padronização do método proposto.....	37
5.3. Protocolo proposto para a detecção de ovos e larvas de helmintos em alface ..	40
5.4. Validação do protocolo proposto para diferentes níveis de contaminação	41
5.5. Análises interlaboratoriais	44
5.6. Aplicação do método proposto a outra matriz	47
5.7. Identificação molecular.....	50
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÕES.....	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
9. ANEXO	80

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Embora o papel específico de nutrientes ou da combinação destes na prevenção de doenças ainda não esteja bem estabelecido, padrões alimentares que enfatizam alimentos integrais, legumes, verduras e frutas estão emergindo como uma importante opção de hábito alimentar. Em geral esse tipo de alimentação está associado à diminuição do risco para uma variedade de doenças crônicas, como as cardiovasculares, o que tem levado a um maior consumo de alimentos crus de origem vegetal, por serem importantes fontes de nutrientes essenciais como vitaminas e minerais. Aliado a estes fatos se destacam ainda características relevantes da maioria dos legumes e frutas em serem pobres em gorduras e calorias, ricos em fibras, e conterem uma razão favorável entre sódio e potássio (WHO 2003; Eyre et al. 2004; Dauchet et al. 2006; Lichtenstein et al. 2006; Heiss et al. 2010).

A crescente exigência de padrões de qualidade aliado ao fato das folhosas se deteriorarem rapidamente, justificam maiores produções de hortaliças em áreas próximas aos grandes centros consumidores, denominadas “cinturões verdes”, que circundam as grandes capitais brasileiras como São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte. No entorno da capital mineira, abrangendo um raio de 80 quilômetros, os municípios de Ibirité, São Joaquim de Bicas, Igarapé, Sarzedo, Mário Campos, Mateus Leme, Pará de Minas, Jaboticatubas, Santa Luzia, Caeté e Esmeraldas, são exemplos entre os cerca de 40 municípios componentes do cinturão verde, cujos produtos são consumidos em todo o estado, mas principalmente na Região Metropolitana de Belo Horizonte (CREA-MG 2009).

Entretanto, a agricultura urbana e periurbana, amplamente praticadas em países em desenvolvimento, criam oportunidades e riscos. Entre os benefícios podemos citar o fácil acesso aos mercados de consumo, menor tempo e custo de transporte, além da geração de empregos e renda agrícola (Pedron et al. 2004). Os riscos podem ser resultantes de contaminações químicas e ou biológicas, que podem ocorrer nas diferentes etapas da produção, indo do cultivo à comercialização desses vegetais.

1.1. Situação das helmintíases no mundo

As infecções por helmintos e enteroprotzoários estão entre os mais frequentes agravos à saúde, sendo estimado que cerca de dois bilhões de pessoas estejam infectadas com helmintos em todo mundo. Geohelmintíases são as infecções mais prevalentes dos helmintos parasitos, com estimativa global de prevalência de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos de 1,2 bilhão, 795 milhões e 740 milhões, respectivamente. Entretanto, os trópicos e subtropicais têm infecção generalizada com os três parasitos citados. Os índices mais elevados de infecção por *Ascaris* ocorrem na China e sudeste da Ásia, nas regiões costeiras da África Ocidental e na África Central. Infecções por *Trichuris* alcançam sua maior prevalência na África central, sul da Índia e Sudeste Asiático. Ancilostomíases, no entanto, são comuns em grande parte da África subsaariana, além do Sul da China e Sudeste da Ásia (de Silva et al. 2003).

Mesmo com este alto número de infecções parasitárias, muitas vezes não são consideradas prioritárias pelas autoridades de saúde, por não estarem associadas com alta mortalidade. No entanto, as enteroparasitoses podem afetar o equilíbrio nutricional, pois interferem na absorção de nutrientes, induzem sangramento intestinal, reduzem a ingestão alimentar e ainda podem causar complicações significativas, como obstrução intestinal, diarreia crônica, crises epiléticas, hipertensão portal, prolapso retal e formação de abscessos, em caso de uma superpopulação, podendo levar o indivíduo à morte. Dentre as crianças a prevalência de verminoses costuma ser alta, devido aos maus hábitos higiênicos dessa faixa etária, podendo os efeitos serem agravados causando redução de crescimento e déficits de aprendizagem. A susceptibilidade às enteroparasitoses varia, dentre outros fatores, com as condições econômicas da população. Parasitoses apresentam uma distribuição cosmopolita, sendo as maiores prevalências verificadas em países em desenvolvimento, especialmente em áreas onde as condições de saneamento e de educação são deficientes e regiões tropicais, onde a temperatura e umidade favorecem o desenvolvimento dos parasitos. Porém, podem ocorrer também em áreas não endêmicas devido a

imigrações e viagens (de Silva et al. 2003; Cooper et al. 2008; Jensen et al. 2009; Norman et al. 2010; Ortega et al. 2010; Pérez-Molina et al. 2010).

No Brasil, as parasitoses intestinais ainda são bastante frequentes. Em um estudo multicêntrico realizado em escolares de 7 a 14 anos cobrindo 10 estados brasileiros, 55,3% dos estudantes foram diagnosticados com algum tipo de parasitose. Em Minas Gerais, dos 5.360 indivíduos examinados, 44,2% estavam infectados, sendo *A. lumbricoides* o parasito mais frequente (59,5%), seguido por *T. trichiura* (36,6%), *Giardia lamblia* (23,8%) e *Schistosoma mansoni* (11,6%) (Campos et al. 1988 apud Rocha et al. 2000). Um levantamento da prevalência das helmintíases intestinais foi realizado em 3 mesorregiões do estado de Minas Gerais: Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba (60 municípios), Noroeste de Minas (13) e Sul/Sudoeste (144). Verificou-se que dos 18.973 escolares examinados, 18,1% encontravam-se parasitados, com a maior prevalência de *A. lumbricoides* (10,3%). Dos escolares infectados, 83,5% apresentavam-se com um parasito, 15,6% com dois parasitos e 0,9% com três parasitos (Carvalho et al. 2002).

Um estudo semelhante com alunos de escolas da rede pública da periferia de Porto Alegre (RS) revelou presença de parasitos em 36% das amostras analisadas, mais uma vez com maior prevalência de *A. lumbricoides*, presente em 50,72% das amostras positivas (Roque et al. 2005).

Silva & Santos (2001) analisando 1850 fichas de crianças com até 12 anos de idade, atendidas no Centro de Saúde Cícero Idelfonso, da regional Oeste da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, para a presença de parasitos, observou a ocorrência de 62,3% de casos positivos, sendo 52,5% para protozoários e 47,5% para helmintos, com alguns casos de crianças poliparasitadas. Os enteroparasitos de maior ocorrência foram *A. lumbricoides* (17%), seguido pelos protozoários *Giardia lamblia* (19%) e *Entamoeba coli* (9%). Esses achados reforçam a relação das parasitoses com áreas onde as condições sócio-econômicas são menos favoráveis. Um estudo da ocorrência de parasitos em crianças oriundas de creches mantidas pela Prefeitura de Belo Horizonte revelou que dos 472 indivíduos analisados, 24,6% apresentavam algum tipo de parasitose, sendo que 6,6% apresentavam mais de um parasito (Menezes et al. 2008).

O espectro parasitário e a prevalência variam nas diferentes regiões de acordo com suas diferenças climáticas, sócio-econômicas, educacionais e de condições sanitárias. As informações sobre a prevalência de helmintos intestinais no Brasil são escassas ou mesmo nulas para determinadas regiões e, quando existente, esta informação é fragmentada e desatualizada. A maioria dos estudos é baseada em amostras de bases populacionais mal definidas, como usuários de serviços de saúde, alunos de escolas públicas e comunidades urbanas carentes. Além disso, o uso de diversas técnicas parasitológicas nesses estudos impede a comparação de dados (Ferreira et al. 2000; Carvalho et al. 2002).

1.2. Contaminações de hortaliças por patógenos de origem fecal

Em termos de gestão de esgoto e contaminação de alimentos, protozoários e helmintos são os parasitos mais preocupantes para a saúde pública (Shahnazi & Jafari-Sabet, 2010). Segundo Strauss (2000), a dose necessária para um patógeno gerar doença em um hospedeiro humano, ou dose infecciosa, é de grande importância. Para helmintos, protozoários e vírus a dose infecciosa é considerada baixa ($<10^2$). Já para as bactérias, é média (10^4) a alta ($>10^6$). Se comparado com outros patógenos, biologicamente, o risco de saúde é mais elevado para infecções provocadas por helmintos, visto sua persistência no ambiente por longos períodos e dose infecciosa pequena. Tais características poderiam justificar a frequente presença de *A. lumbricoides* como contaminante de vegetais (Amoah et al. 2006).

A irrigação de hortaliças com águas residuais é praticada em todo o mundo, sendo mais comum em áreas urbanas e países em desenvolvimento, que não têm capacidade para tratar eficazmente águas contaminadas (Scott et al. 2004; Ensink et al. 2005). Este tipo de água utilizada na irrigação proporciona aumento da produtividade e redução do uso de fertilizantes inorgânicos, constituindo a única alternativa de algumas localidades que sofrem com a escassez de recursos hídricos. Dentre os principais riscos de saúde associados a esta prática estão as infecções intestinais por nematodas, em especial infecções por *Ascaris lumbricoides* que também estão associados com o uso de excrementos como fertilizantes na agricultura (Trang et al. 2007).

A Organização Mundial da Saúde reconhece os benefícios que podem resultar da utilização na agricultura de águas residuais corretamente tratadas e buscam fomentar sua utilização segura, considerando as condições sociais, epidemiológicas e econômicas existentes. Com isso propõe medidas para reduzir essas e outras infecções, incluindo melhoramento dos métodos de irrigação, a interrupção da irrigação antes da colheita, o controle da exposição humana, e técnicas de preparação de alimentos que visem a uma redução de patógenos em geral (WHO 2006). O risco para a população depende do modo de irrigação, sendo maior em culturas irrigadas por aspersão. Culturas com vida útil longa também podem representar um risco potencial para os consumidores se os ovos tiverem tempo e condições favoráveis para se tornarem infectantes (Blumenthal et al. 2000). Keraita e colaboradores (2007) mostraram que a interrupção da irrigação de hortaliças antes da colheita pode efetivamente reduzir a contaminação biológica durante a estação seca em regiões de clima tropical, não sendo eficaz na redução da contaminação durante períodos chuvosos, quando é possível uma nova contaminação das hortaliças por meio de respingos de solos e do aumento da umidade que, geralmente, favorece a sobrevivência do patógeno. Além disso, tal medida de proteção da saúde pode ser difícil de ser cumprida para as culturas de folhas que devem ser colhidas frescas e perdem umidade com facilidade.

A longo prazo, a irrigação com águas residuais causam acumulação de metais pesados no solo, enriquecendo-os fortemente com cobre, zinco, manganês e níquel, dentre outros metais (Jan et al. 2010; Xue et al. 2011). Estudos demonstram que os vegetais cultivados em solos irrigados com águas residuais apresentam significativa acumulação desses metais pesados em suas partes comestíveis, representando um risco à saúde quando associado ao consumo por um longo período de tempo (Gupta et al. 2010; Xue et al. 2011).

Como alternativa ao uso de fertilizantes químicos e sua poluição associada, especialistas defendem o uso de adubação orgânica, com excretas humanas e animais (Mariwah & Drangert 2011). Tradicionalmente, os dejetos humanos (fezes e ou urina) têm sido utilizados para adubação de culturas em muitos países, incluindo Japão, China e Suécia (Esrey et al. 1998). No Vietnã, onde se pratica este tipo de adubação, há prevalência de infecções por helmintos superior a 80% em algumas

áreas rurais, possivelmente relacionada ao uso generalizado dos excrementos como fertilizantes na agricultura (Jensen et al. 2009).

Tratamentos pós-colheita também podem constituir uma fonte de contaminação por parasitos às hortaliças. Em estudo realizado no Paquistão observou-se concentração de helmintos de 0,7 ovos/grama em vegetais provenientes do campo. Já naqueles recolhidos no mercado, a concentração foi de 2,1 ovos/g. Neste estudo, alguns vegetais como a couve-flor, por exemplo, estavam livres de ovos de helmintos no campo, mas encontravam-se contaminados no local de comércio, sugerindo que condições higiênicas deficientes no manejo pós-colheita constituem importante fonte de transmissão direta e de contaminação cruzada de alimentos com helmintos e outros agentes patogênicos, podendo até mesmo causar maior contaminação fecal que o uso de águas residuais na irrigação (Ensink et al. 2007). No Brasil, estudos semelhantes foram realizados em Ribeirão Preto, São Paulo. Embora tenham sido conduzidos em diferentes épocas, as avaliações das condições higiênico-sanitárias de hortaliças em hortas (Takayanagui et al. 2000) e no comércio (Takayanagui et al. 2001) demonstraram que a frequência de contaminação nos dois extremos da cadeia de produção de hortaliças foi bastante discrepante, com 20% e 58,1%, respectivamente. Tais resultados, possivelmente, foram decorrentes do risco acumulado de contaminação nas sucessivas etapas do processo produtivo, incluindo o transporte e a manipulação de alimentos.

As hortaliças também podem sofrer contaminações nos processos finais da cadeia produtiva, durante o preparo para sua comercialização, seja *in natura* ou processada. Parasitoses intestinais são, na sua maioria, transmitidas pela rota fecal-oral, e a manipulação de alimentos é uma forma de dispersão de patógenos, por falta de lavagem regular das mãos, dentre outros hábitos inadequados de higiene. Um estudo realizado com 259 manipuladores de alimentos em uma área de Omdurman, no Sudão, revelou que 30,1% estavam positivos para um ou mais patógenos, principalmente *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Entamoeba histolytica/dispar*, e *Giardia lamblia*, sendo este último detectado em 20,5% das amostras analisadas (Saeed & Ramid 2010). Em Abeokuta, Nigéria, um estudo com 100 vendedores de alimentos revelou que 97% estavam infectados com um ou mais parasitos de transmissão fecal-oral. Os parasitos mais prevalentes foram

Entamoeba histolytica (72%), *Ascaris lumbricoides* (54%), *Enterobius vermicularis* (27%), *Trichuris trichiura* (24%) e *Giardia duodenalis* (13%) (Idowu & Rowland 2006).

Em pesquisa realizada com trabalhadores de uma empresa de alimentos (*fast-food*) e com trabalhadores de feiras livres e sacolões da cidade de Florianópolis, observou-se elevado parasitismo, com ocorrência de enteroparasitoses em 42,85% e 47,06% para trabalhadores dos dois locais analisados, respectivamente. Dentre os protozoários, o organismo mais frequente foi *Endolimax nana*, seguido por *Blastocystis hominis*. *Enterobius vermicularis* e *Strongyloides stercoralis* foram os helmintos prevalentes. Estes resultados foram atribuídos à baixa renda familiar, ao número de pessoas residentes em cada domicílio, à escolaridade e, principalmente, ao hábito de ingerir verduras e frutas sem a devida higienização (Nolla & Cantos 2005). Os manipuladores de alimentos desempenham, portanto, importante papel na transmissão de doenças veiculadas por alimentos, variando o risco de acordo com o grau de contato com o produto (Nolla & Cantos 2005; Takizawa et al. 2009; Saeed & Ramid 2010).

1.3. Ocorrência de enteroparasitos em hortaliças

Visto a relevância e atualidade do problema, diversos trabalhos, principalmente em países em desenvolvimento, são realizados visando avaliar o grau de contaminação de hortaliças por patógenos. Altos índices de contaminações por enteroparasitos em hortaliças são relatados, indicando um crescente número de casos notificados de doenças de origem alimentar ligada a produtos frescos, demonstrando a importância dos vegetais, principalmente aqueles consumidos crus, como veículos de transmissão de infecções parasitárias (Damen et al. 2007; Nyarango et al. 2008; Do et al. 2009; Al-Megrin 2010; Shahnazi & Jafari-Sabet 2010). Tal verificação reveste-se de grande interesse para saúde pública, pois fornece dados para a vigilância sanitária sobre o estado higiênico desses produtos e permite a análise retrospectiva das condições em que foram cultivados (Simões et al. 2001; Soares & Cantos 2005).

A presença de ovos de helmintos parasitos humanos, mesmo que em vegetais que serão lavados antes do consumo, é preocupante visto que nem sempre

essa lavagem é eficaz na eliminação das formas de transmissão dos parasitos. Massara e colaboradores (2003), estudando a ação de 16 produtos detergentes e desinfetantes de uso doméstico e laboratorial sobre a embriogênese de *A. lumbricoides*, observaram que cinco produtos inibiram o embrionamento dos ovos em mais de 50%, seis inibiram o embrionamento em menos de 50% e três não tiveram efeito algum sobre o embrionamento dos ovos. Por outro lado, com um dos produtos testados, observou-se aumento da porcentagem de embrionamento dos ovos em relação aos controles.

Um estudo realizado para determinar o nível de contaminação por enteroparasitos em hortaliças comercializadas em três cidades do sudoeste da Nigéria mostra que 68,3% das hortaliças foram positivas para parasitos intestinais, sendo encontrados *A. lumbricoides* (16,7%), ancilostomídeos (18,3%), *Taenia* spp (4,2%), *Strongyloides stercoralis* (45,8%) e *Balantidium coli* (0,8%) (Do et al. 2009). Em Hanói, no Vietnã, estudo semelhante foi conduzido resultando em 26% das amostras positivas para ovos de parasitos, sendo a maior contaminação encontrada em hortaliças folhosas (31%) (Uga et al. 2009).

Em Accra, capital de Gana, 180 amostras de vegetais entre alface, repolho e cebolinha, foram coletadas em mercados e analisadas quanto à presença de parasitos intestinais. Das amostras analisadas, 70% apresentavam algum tipo de contaminação. Foram identificados ovos de *Ancylostoma duodenale*, *Schistosoma heamatobium*, *Trichuris trichiura* e *A. lumbricoides*, predominando este último (Amoah et al. 2007).

No Brasil, Falavigna e colaboradores (2005) encontraram um índice de 63% de contaminação por helmintos e protozoários em hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, sendo ovos de Ancylostomatoidea, larvas de Rhabditoidea e de Ancylostomatoidea, as formas mais prevalentes, correspondendo a 77%, 45% e 21%, respectivamente.

Avaliando a presença de estruturas parasitárias em agrião, alface e rúcula coletadas em cinco pontos de comercialização de hortaliças em Florianópolis (SC), Soares & Cantos (2006) encontraram índices de contaminação de 70,4%, 60% e 56%, respectivamente para cada tipo de hortaliça. Dos helmintos encontrados

contaminando as hortaliças, os mais frequentes foram os ancilostomídeos, presentes em 96 (12,8%) das 750 amostras analisadas.

Em Guarapuava (PR), um estudo semelhante analisou 94 amostras de hortaliças, constatando que 44,7% apresentavam-se positivas para a presença de algum tipo de enteroparasito, sendo que os principais observados foram membros da família Ancylostomatidae (85,7%), seguidos por *Strongyloides* sp (28,5%), *Giardia* sp (4,7%) e *Enterobius* sp (2,3%) (Ono et al. 2005).

Em alfaces cultivadas no sistema orgânico também se encontram altos índices de contaminação parasitária, chegando a 26,7% de amostras contaminadas por ovos de ancilostomídeos e 20% por cistos de *Entamoeba* sp que, apesar de não ser considerado patogênico, apresenta grande valor como indicador de condições higiênicas inadequadas, uma vez que sua presença indica contaminação por matéria fecal humana (Arbos et al. 2010). Um trabalho comparativo entre os sistemas de cultivo hidropônico, tradicional e orgânico, avaliando a qualidade parasitológica de amostras de alface, constatou que para todos os tipos de helmintos e protozoários intestinais encontrados, as amostras de alface de cultivo orgânico apresentaram as maiores frequências de ocorrência, enquanto que o menor índice de contaminação foi observado nas amostras do sistema hidropônico (Santana et al. 2006).

Estudos semelhantes foram feitos em várias outras cidades de Minas Gerais e de outros estados tais como Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná, Pernambuco e Rio de Janeiro (Coelho et al. 2001; Simões et al. 2001; Takayanagui et al. 2001; Freitas, A. et al. 2004; Silva et al. 2005), revelando altos índices de contaminação de verduras por enteroparasitos.

1.4. Métodos de detecção de parasitos em vegetais

Existem vários métodos descritos para avaliar a contaminação por helmintos e protozoários em vegetais. Considerando a contaminação por helmintos, Bier (1991) apresentou o método utilizado pelo FDA (Food and Drug Administration) e avaliou seu percentual de recuperação. Neste método, derivado de procedimentos para isolar da água protozoários parasitos, os vegetais são lavados com uma solução à base de dodecil sulfato de sódio e Tween 80, e a sonicação é utilizada

para a extração dos parasitos, que são concentrados por centrifugação e, por fim, fixados em formaldeído 4%. No caso de grande quantidade de material estranho no sedimento, ainda pode ser feita a técnica de Sheather, que consiste na flutuação dos ovos e oocistos de parasitos em solução saturada de açúcar. O sobrenadante é coletado após centrifugação e lavado duas vezes em água destilada. Após, procede-se com a identificação dos parasitos.

Porém, os inquéritos relatados no tópico anterior e outros trabalhos de avaliação da contaminação parasitológica em vegetais são de difícil comparação, haja vista a utilização de uma diversidade de metodologias que, em geral, são derivadas de métodos sabidamente eficazes para outras matrizes, como água e fezes, mas que não apresentam estudos sobre o desempenho dos mesmos quando adaptados para vegetais. Envolve três etapas básicas: lavagem da hortaliça, concentração das formas parasitárias (ovos, larvas, cistos e oocistos), seguido da identificação do material recuperado, analisando-se lâminas feitas com o material concentrado, sob microscopia óptica. O quadro a seguir (Quadro 1) apresenta uma descrição sucinta de algumas metodologias para a detecção de parasitos em vegetais utilizadas em trabalhos referenciados nesta dissertação.

Quadro 1: Descrição das etapas-chave de diferentes métodos de detecção de parasitos em vegetais

Local de pesquisa	Líquido de lavagem	Forma de extração	Forma de concentração	Referência
Jos - Nigéria	Detergente catiônico	Escovação nessa solução detergente, contendo vidro em pó	Centrífugo-flutuação	Damen et al. 2007
Riyadh - Arábia Saudita	Solução fisiológica (0,95% NaCl)	Repouso em saco plástico com a solução, overnight	Sedimentação espontânea e centrifugação	Al- Megrin 2010
Bursa - Turquia	Solução detergente (dodecil sulfato de sódio 1% e Tween 80 0.1%)	Repouso em solução detergente por 12 h	Centrifugação e centrífugo-flutuação em solução saturada de NaCl	Avcioglu et al. 2011
Barquisimeto-Cabudare, Venezuela	Água potável, previamente filtrada e fervida	Repouso em frasco estéril, por 24h	Sedimentação espontânea e centrifugação	Traviezo-Valles et al. 2004
Qazvin Province, Iran	Solução detergente (dodecil sulfato de sódio 1% e Tween 80 0.1%)	Sonicação por 10 minutos em solução detergente	Centrifugação	Shahnazi & Jafari-Sabet 2010
Kisii Municipality, Kenya	Água destilada	Não consta	Centrifugação simples e centrífugo flutuação em sulfato de magnésio	Nyarango et al. 2008
São José dos Pinhais e Colombo, PR - Brasil	Água destilada	Agitação manual em sacos de polietileno, por 30 segundos	Sedimentação espontânea por 24h	Arbos et al. 2010

Florianópolis, SC - Brasil	Água destilada	Lavagem manual de cada folha do vegetal	Sedimentação espontânea por 24h	Cantos et al. 2004
Sorocaba, SP - Brasil	Água filtrada com 5 gotas de Tween 80	Lavagem manual e repouso em solução detergente por 3h	Sedimentação espontânea por 24h	Coelho et al. 2001
RM do Recife, PE - Brasil	Solução salina (NaCl 0.85%)	Lavagem das folhas com pincel e repouso por 5 minutos	Sedimentação espontânea por 24h	Silva et al. 2005
Maringá e Sarandi, PR - Brasil	Solução de Extran MA02 [®] em água destilada	Não consta	Sedimentação espontânea por 24h	Falavigna et al. 2005
Campo Mourão, PR - Brasil	Solução de lauril sulfato triptose 1%	Lavagem com frasco lavador, direcionando-se os jatos às folhas	Sedimentação espontânea por 1h	Freitas, A et al. 2004
Feira do produtor de Maringá, PR, Brasil	Solução de Extran MA02 [®] em solução salina	Lavagem das folhas com pincel	Sedimentação espontânea por 24h	Guilherme et al. 1999
Ribeirão Preto, SP - Brasil	Água destilada	Agitação manual em saco plástico por 30s e lavagem com um pincel	Sedimentação espontânea por 24h	Takayanagui et al. 2000
Niterói e Rio de Janeiro, Brasil	Água destilada	Lavagem em recipiente plástico com água destilada, folha a folha	Sedimentação espontânea por 1h e técnica de flutuação com solução de sacarose (Técnica de Sheather)	Mesquita et al. 1999

Ribeirão Preto, SP - Brasil	Água destilada	Não consta	Sedimentação espontânea por 24h e centrifugo-flutuação em sulfato de zinco	Takayanagui et al. 2007
Região metropolitana de São Paulo, SP - Brasil	Solução de Extran MA 02 [®] em solução fisiológica	Lavagem das folhas com pincel, deixando-se em repouso por alguns segundos	Sedimentação espontânea por 24h, centrifugação, centrifugo-flutuação em solução de sulfato de zinco e nova centrifugação em água	Oliveira & Germano 1992
Guarapuava, PR - Brasil	Solução salina com 0,005% de Extran MA 02 [®]	Lavagem das folhas com pincel	Sedimentação espontânea por 24h, centrifugação, centrifugo-flutuação em solução saturada de cloreto de sódio	Ono et al. 2005
Niterói, RJ - Brasil	Água destilada	Não consta	Sedimentação espontânea por 1h seguida das técnicas de Faust e Lutz	Paula et al. 2003
Salvador, BA - Brasil	Água destilada	Não consta	Centrifugação simples e centrifugo-flutuação em sulfato de zinco (Faust)	Santana et al. 2006
Florianópolis, SC - Brasil	Solução detergente (0,3 mg/ml de lauril éter sulfato de sódio e 0,25 mg/ml de álcool láurico etoxilado)	Repouso em solução detergente por 20 min. Lavagem das folhas com pincel, deixando-se em repouso por mais alguns segundos	Sedimentação espontânea por 24h e centrifugação	Soares & Cantos 2005
Lavras, MG - Brasil	Água destilada e solução detergente (Irgasan [®] 0,5% em água destilada)	Agitação manual em saco plástico com água e lavagem com pincel em solução detergente	Sedimentação espontânea por 24h, centrifugação e flotação em solução de Sheather e de sulfato de zinco 33%	Guimarães et al. 2003

1.5. Identificação molecular de parasitos

Como parte final do diagnóstico parasitológico de verduras está a identificação específica dos parasitos observados. Isso se dá, geralmente, pela observação de características morfológicas das formas parasitárias encontradas. Porém, em determinadas fases do ciclo de vida dos ancilostomídeos, este tipo de identificação é bastante dificultada pela semelhança até mesmo com outros gêneros. A identificação específica tem importância para estudos epidemiológicos, na diferenciação de parasitos de animais e humanos, além de ser fundamental para estratégias de controle (Falavigna et al. 2005; Yong et al. 2007).

Métodos moleculares têm sido amplamente utilizados para a diferenciação de espécies parasitárias morfológicamente semelhantes. Neste contexto, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido bem sucedida como método específico, sensível e de rápida detecção de patógenos em uma variedade de matrizes, tais como água, solo e alimentos. Cada unidade repetitiva do rDNA é composta pelos genes codificadores ribossomais 18S, 5.8S e 28S, intercalados por dois espaçadores, conhecidos como ITS-1 e ITS-2 (Figura 1). A região intergênica (ITS) tem frequentemente sido empregada na identificação de espécies, como, por exemplo, o relatado por Mochizuki e colaboradores (2006) que padronizaram a identificação espécie-específica de *Mecistocirrus digitatus* a partir de fezes bovinas.

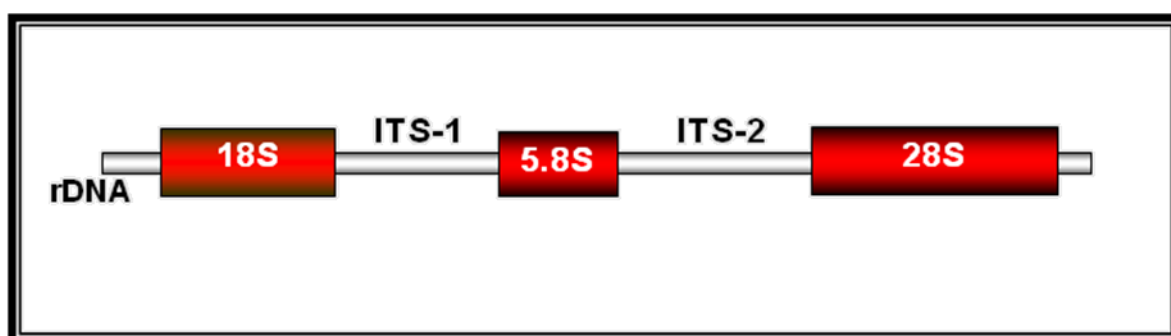


Figura 1: Esquema representativo da unidade repetitiva do rDNA de eucariotos.

Segundo Clara e Silva e colaboradores (2006), a região ITS das espécies *Ancylostoma caninum*, *A. ceylanicum* e *A. braziliense* é altamente conservada,

apresentando polimorfismo interespecífico de 12,3%. Pequenas deleções ou inserções alteram a sequência de DNA de um organismo. Uma única substituição de bases pode criar ou eliminar um sítio capaz de ser digerido por uma endonuclease de restrição, gerando diferenças no tamanho destes fragmentos de DNA (Singh 1997). Essas pequenas diferenças são conhecidas como polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP). O emprego da técnica de RFLP, utilizando a enzima *Hinf-I* para digerir a região ITS, produziu fragmentos de DNA de tamanhos diferentes entre as três espécies citadas do gênero *Ancylostoma*, permitindo um diagnóstico diferencial entre elas (Clara e Silva et al. 2006).

O DNA utilizado para os métodos moleculares é geralmente extraído de vermes adultos, larvas ou das próprias fezes. Mas nem sempre isso é possível e por isso métodos alternativos para a PCR, partindo diretamente de ovos de helmintos, com e sem extração prévia de DNA, tem sido relatados, sendo uma potencial otimização na pesquisa de parasitos em verduras (Gasser et al. 1993; Hodgkinson et al. 2005; Pecson et al. 2006; Carlsgart et al. 2009).

1.6. Controle sanitário de hortaliças

No Brasil, o relato de infecções veiculadas por hortaliças frescas tem despertado o interesse da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que passou a sugerir análises microbiológicas, parasitológicas e de resíduos de metais pesados em vegetais minimamente processados. Porém, os laboratórios de saúde pública que atendem ao governo e/ou a órgãos regulamentadores devem trabalhar com métodos padronizados, que forneçam resultados confiáveis e reprodutíveis. Métodos bem estabelecidos também interessam ao setor de controle de qualidade das empresas privadas, visando interromper processos insatisfatórios quanto às condições higiênico-sanitárias, prevenindo infecções ou intoxicações alimentares veiculadas por alimentos industrializados, tais como os vegetais minimamente processados (Cook et al. 2006a; Freitas, EI et al. 2006; Oliveira et al. 2010). Segundo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (2005), o laboratório deve utilizar métodos apropriados para os ensaios que realiza, sendo de preferência, aqueles

publicados em normas internacionais, regionais ou nacionais. Quando um método é desenvolvido pelo laboratório, deve ser devidamente validado antes de ser utilizado.

A validação deve garantir, por meios experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para isso deve haver evidências objetivas de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. Essas evidências são representadas por parâmetros tais como especificidade, linearidade, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, que podem variar de acordo com a análise (ABNT NBR ISO/IEC 17025, 2005; Resolução n. 899, 2003).

A Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 175 (2003), da ANVISA, que aprova o “Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados”, contempla os parasitos dentre tais matérias com risco à saúde. Entende-se, portanto, que a presença de parasitos torna o produto impróprio ao consumo humano.

Métodos analíticos que fornecem resultados binários, do tipo presença/ausência ou positivo/negativo, são chamados qualitativos. Os indicadores de desempenho para métodos qualitativos são: sensibilidade (probabilidade de o método fornecer resultado positivo quando a amostra é realmente positiva), especificidade (probabilidade de o método fornecer resultado negativo quando a amostra é realmente negativa), falso negativo (probabilidade de um teste, conhecidamente positivo, ser classificado como negativo pelo método) e falso positivo (probabilidade de um teste, conhecidamente negativo, ser classificado como positivo pelo método). Também podem ser avaliados o limite de detecção, que representa a mais baixa concentração do analito que o método pode detectar de forma confiável como positiva na matriz dada, e a robustez do método, ou seja, as variações observadas na resposta do método mediante alterações nas suas condições de operação (Soler 2006; Cook et al. 2006b; Freitas, EI et al. 2006).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Com o relato de doenças infecciosas associadas ao consumo de frutas e hortaliças *in natura* e a crescente demanda por alimentos minimamente processados e de refeições servidas fora de casa, agências de saúde pública de todo o mundo estão preocupadas com a garantia da segurança alimentar, havendo uma necessidade de controlar toda a cadeia produtiva das hortaliças (Coelho et al. 2001; Simões et al. 2001; Cook et al. 2006a; Oliveira et al. 2010). A tudo isso, soma-se o hábito de consumir hortaliças cruas, aumentando a exposição da população aos parasitos intestinais. Apesar da crescente importância dos produtos frescos como um veículo para patógenos humanos, o conhecimento sobre os pontos de contaminação na cadeia produtiva e sobre a sobrevivência de patógenos humanos em frutas e legumes ainda é limitado.

Há grande diversidade de metodologias utilizadas na pesquisa de parasitos em verduras. Tais metodologias utilizam técnicas já bem estabelecidas para análises de material fecal e água, adaptando-as para a análise de verduras. Apesar do FDA ter publicado um método de isolamento de parasitos em vegetais, este apresenta percentual de recuperação muito baixo, de apenas 10% para ovos de *Trichuris* sp e *Ascaris* sp (Bier 1991). Os índices de contaminação de vegetais por enteroparasitos podem estar sendo subestimados, haja vista a falta de informação acerca do desempenho da maioria dos métodos utilizados na recuperação das formas parasitárias em vegetais. A grande variedade de técnicas demonstra a falta de consenso entre os laboratórios que realizam este tipo de estudo, o que dificulta uma padronização dos inquéritos realizados na análise de alimentos contaminados, dificultando a comparação de dados de pesquisa obtidos por diferentes grupos no Brasil e no mundo.

Considerando que a avaliação parasitológica de hortaliças ainda não tem a devida importância nos protocolos de qualidade destes alimentos e a falta de estudo acerca de metodologias que avaliem esse parâmetro de qualidade, o estudo aqui proposto busca maior conhecimento científico-tecnológico para o diagnóstico de contaminantes parasitários, podendo contribuir futuramente com ações de vigilância sanitária e epidemiológica.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Padronizar um método de detecção de ovos e larvas de helmintos em alface.

3.2. Objetivos específicos

- Padronizar etapas de um método de detecção de ovos e larvas de helmintos em alface;
- Validar o método padronizado, por meio de testes de recuperação, usando amostras de alface contaminadas artificialmente;
- Realizar análises interlaboratoriais e com outra matriz vegetal, visando comprovar o desempenho do método;
- Testar a utilização de técnicas moleculares a partir de um baixo número de ovos de ancilostomídeos.

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção dos parasitos para contaminação artificial

Para a contaminação artificial de amostras foram usados ovos e larvas de *Ancylostoma ceylanicum*, e ovos de *Ancylostoma caninum* e *Ascaris suum*, representando as formas em que os helmintos são detectados nos vegetais. Os ancilostomídeos foram escolhidos devido à alta frequência em que ocorrem nos resultados de análise parasitológica de verduras (Simões et al. 2001; Cantos et al. 2004; Traviezo-Valles et al. 2004; Al-Binali et al. 2006; Santana et al. 2006). Embora, a espécie *A. ceylanicum* não seja endêmica no Brasil, também foi usada como modelo, tendo em vista que seu ciclo é mantido em nosso laboratório.

Já os ovos de *A. suum* foram escolhidos por possuírem características bastante distintas daqueles de ancilostomídeos, mas por outro lado se assemelham aos de *A. lumbricoides*, que é a espécie encontrada em humanos e transmitida pela ingestão de ovos com larvas de terceiro estágio (Jensen et al. 2009). Os ovos de *A. suum* foram cedidos, gentilmente, por Joziana Muniz de Paiva Barçante. Foram obtidos diretamente de um verme adulto fêmea, limpos e acrescidos de solução de formol 10% para conservação, e armazenados em geladeira.

Ovos de ancilostomídeos foram obtidos de fezes de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados experimentalmente com *A. ceylanicum*, e de fezes de cães sabidamente infectados por *A. caninum*. O material fecal foi submetido à técnica de sedimentação por centrifugação formol-éter (Blagg et al. 1955), sendo previamente diluído em água destilada. Essa suspensão foi filtrada em gaze dobrada quatro vezes para retenção de grandes detritos. O líquido filtrado foi distribuído em tubos, completado com água destilada e centrifugado a 1120 x g por 3 minutos, e esse processo repetido por 3 a 4 vezes, até que o sobrenadante ficasse claro. Em seguida, 4 mL de éter foram adicionados a cada tubo, e estes centrifugados como descrito anteriormente para a separação dos detritos. O sobrenadante foi descartado, descolando inicialmente a camada de detritos aderida à parede do tubo. O sedimento contendo os ovos de ancilostomídeos foi colocado em tubo de

centrífuga, e o volume completado com água para 15 mL, para nova lavagem do material. Novamente o tubo foi centrifugado para concentração dos parasitos, sendo o novo sedimento acrescido de solução de formol 10%, para conservação, e armazenado em geladeira. A verificação da presença de ovos de parasitos e sua identificação foram feitas através de observação de pequenas alíquotas do sedimento ao microscópio óptico.

As larvas foram obtidas após coprocultura de 7 dias feita com fezes de hamsters infectados experimentalmente com *A. ceylanicum* e vermiculita, deixada em estufa a 27°C. Para recuperação das larvas L3 foi feita a técnica de Baermann modificado por Moraes (Moraes 1948). Cerca de 10g da coprocultura foram colocados em gaze dobrada em quatro e este conjunto colocado sobre um funil de vidro contendo um tubo de borracha conectado à extremidade inferior de sua haste. A borracha foi obliterada com uma pinça, adicionando-se água aquecida (45°C) ao funil, em quantidade suficiente para entrar em contato com as fezes, permanecendo em repouso durante uma noite. Em seguida, a pinça foi aberta recolhendo-se cerca de 7 mL de sedimento em tubo de centrífuga e o volume completado com água para 10 mL, centrifugando por 2 minutos a 1120 x g. O sobrenadante foi descartado, o sedimento homogeneizado com solução de etanol 70%, para conservação, e armazenado em geladeira.

A quantificação de ovos e larvas por microlitros da suspensão de cada gênero de parasito foi feita por agitação em vórtex por 1 minuto do tubo contendo a suspensão e imediata pipetagem de 10 µL para uma lâmina de vidro, seguido de contagem das formas parasitárias sob microscopia óptica. Esse procedimento foi repetido 10 vezes para cada um dos parasitos e a média desse resultado foi considerada como o valor estimado de ovos e larvas na suspensão utilizada para contaminação artificial das amostras (Cook et al. 2006a; Jensen et al. 2009).

4.2. Amostras de alface

A hortaliça de escolha para a padronização da metodologia foi a alface (*Lactuca sativa*) por ser uma das folhosas mais comercializadas no Brasil (Maistro 2001; Santana et al. 2006). Segundo dados da CEASA/MG, em 2010 foram

comercializados, na Grande BH, 594.720 kg de alface. Além disso, essa verdura faz parte da maioria dos trabalhos nessa área, por ser consumida crua, aumentando o risco de seu consumo quando as condições sanitárias são inadequadas (Ripabelli et al. 2004).

Alfaces minimamente processadas, pelo fato de serem sanitizadas e, portanto, apresentarem menor probabilidade de conterem parasitos, foram adquiridas em supermercados da cidade de Belo Horizonte. Cada amostra a ser contaminada artificialmente foi composta por 30g de folhas de alface, quantidade que reflete uma porção média consumida por vez (Anonymous 1993 apud Cook et al. 2006a).

4.3. Contaminação artificial das amostras

A contaminação era feita antes de se proceder com as análises. Cada amostra de alface foi pesada (30g) e suas folhas dispostas em um recipiente, sem que ficassem totalmente sobrepostas. Ovos de ambos os gêneros e larvas de *A. ceylanicum* foram pipetados sobre diferentes áreas na superfície das folhas. Para garantir que todos os parasitos fossem distribuídos, foi pipetado em seguida o mesmo volume de água destilada em outros pontos da superfície da verdura, para lavar os possíveis ovos e larvas que estivessem retidos na ponteira, deixando secar à temperatura ambiente por cerca de uma hora e meia ou até que a superfície se tornasse seca (Cook et al. 2006a).

4.4. Extração e concentração das formas parasitárias

Para a padronização do método, cada etapa e suas variáveis, foram testadas em triplicata. A extração de ovos de parasitos envolve a adição de um líquido extrator, seguida de homogeneização, para a remoção dos parasitos da superfície da alface.

Para o teste do líquido extrator, 3 amostras foram pesadas (30g cada) e contaminadas artificialmente, conforme item 4.3. Em seguida foram colocadas em saco plástico (24 x 34 x 0.5 cm) de primeiro uso, adicionando-se às folhas de alface 200 mL do líquido a ser testado. O conjunto foi agitado manualmente por 3 minutos

e, cortando-se uma das pontas do saco plástico, o líquido foi escoado, sendo filtrado por peneira (abertura de 1 mm) diretamente em cálice cônico. Após, deixava-se sedimentando por 24 horas. Decorrido o tempo de sedimentação, o sobrenadante foi descartado com auxílio de uma pipeta, deixando-se um sedimento de cerca de 10 mL, transferindo-o para um tubo de centrifuga de 15 mL. O cálice de sedimentação foi lavado com 5 mL de água destilada, adicionada ao mesmo tubo e centrifugado a 1120 x g por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o sedimento homogeneizado com pipeta Pasteur. Por fim, foram feitas lâminas deste sedimento para contagem e identificação dos ovos e larvas recuperados (Traviezo-Valles et al. 2004; Soares & Cantos 2005).

Foram testados como líquidos extratores: água destilada, solução 0,1% de Tween 80, solução de glicina 1M e solução de lauril sulfato de sódio 1% (Coelho et al. 2001; Cantos et al. 2004; Cook et al. 2006a). Inicialmente, triplicatas de amostras de alface foram contaminadas com aproximadamente 100 ovos de *A. suum* e 100 ovos de ancilostomídeos. Separadamente foram lavadas com 200 mL de cada líquido citado e, ao fim da técnica de concentração, os dois líquidos extratores com melhores desempenhos foram testados em triplicata novamente, com inclusão de aproximadamente 50 larvas de *A. ceylanicum* à contaminação artificial, e aquele que apresentou a melhor média de recuperação foi escolhido para os demais testes e repetições necessários para a padronização e validação do método.

Ainda na fase de extração das formas parasitárias foram testadas, em triplicata, a homogeneização manual, onde a amostra foi colocada em saco plástico de primeiro uso, acrescida de 200 mL de solução de glicina 1M e agitada manualmente durante 1 e 3 minutos, bem como a homogeneização mecânica em Stomacher[®], com agitação por 60 segundos em baixa rotação, com 200 mL de líquido extrator para cada amostra (Cook et al. 2006a). As demais etapas de extração e concentração das formas parasitárias foram semelhantes ao teste anterior, variando somente os procedimentos de homogeneização, e aquele que apresentou melhor média de recuperação foi escolhido para os demais testes e repetições necessários para a padronização e validação do método.

Após lavagem com solução de glicina 1M e homogeneização da amostra por agitação manual durante 3 minutos, o líquido de lavagem foi filtrado e deixado em

repouso para sedimentação. Foram testados, também em triplicata, os tempos de 1, 2 e 24 horas de repouso (Mesquita et al. 1999; Guimarães et al. 2003; Freitas, A.A. et al. 2004, Soares & Cantos 2005).

4.5. Análise microscópica

Os ovos e larvas foram visualizados por microscopia óptica e contados em sua totalidade. Foram empregados aumentos de 100x e/ou 200x, suficientes para detecção e identificação dos contaminantes.

4.6. Determinação do percentual de recuperação do método proposto

Seguindo o protocolo padronizado foram analisadas amostras divididas nos seguintes grupos:

- a) amostra controle ou branco: amostras não contaminadas artificialmente e, supostamente, isentas de parasitos;
- b) amostras contaminadas: amostras contaminadas artificialmente, como descrito no item 4.3, e divididas em cinco níveis de contaminação diferentes (Quadro 2).

Quadro 2: Número aproximado de ovos e larvas presentes em cada nível de contaminação artificial.

Níveis de contaminação	Ovos de <i>A. suum</i> *	Ovos de ancilostomídeos*	Larvas de <i>A. ceylanicum</i> *
Nível 1	100	100	50
Nível 2	50	50	25
Nível 3	20	20	10
Nível 4	11	12	6
Nível 5	5	6	3

*Número de ovos e larvas adicionados a 30g de folhas do vegetal.

O cálculo da porcentagem de recuperação do método foi feito por comparação entre o número médio de ovos e larvas recuperados em cada teste e o número de formas parasitárias usadas na contaminação artificial.

4.7. Análises interlaboratoriais

Para testar o desempenho do método sob condições diferentes das testadas na padronização e validação, foram realizadas análises interlaboratoriais. Para isso amostras em triplicatas foram contaminadas com os níveis 1, 2 e 3 (conforme descrito no item 4.3 e Quadro 2). As amostras foram embaladas em saco plástico que foi selado, armazenadas em caixa de isopor e entregues aos responsáveis pelos laboratórios que se dispuseram a fazer as análises: Professora Dra. Adriana Oliveira Costa, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG; Professora Dra. Joziana Muniz de Paiva Barçante, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras; e Maria Helena Martini, responsável pela área de Microscopia Alimentar do Centro de Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz Campinas. No caso do laboratório em Campinas, São Paulo, essas amostras foram enviadas pelo correio, chegando aproximadamente 24 horas após a contaminação ao laboratório de destino. Também foram enviados para esses laboratórios o protocolo de análise e o reagente necessário. Essas amostras foram numeradas sequencialmente, sendo desconhecido o nível de contaminação artificial de cada uma para o analista que a recebeu, constituindo um teste cego. Também foram enviadas amostras sem contaminação artificial.

4.8. Aplicação do método proposto a outra matriz

Visando testar o desempenho do método, também foram realizadas análises com outro tipo de matriz, ou seja, com outro vegetal. Rúcula foi o vegetal escolhido, por também ser consumido cru na maioria das vezes. Cinco amostras minimamente processadas e sem contaminação artificial foram analisadas. Além dessas, quadruplicatas de amostras, também compostas por 30g de folhas do vegetal pronto

para o consumo, foram contaminadas artificialmente com cada um dos cinco níveis de contaminação (conforme item 4.3 e Quadro 2).

4.9. Análise de dados

Para a análise estatística dos dados gerados neste trabalho foi utilizado o *software* GraphPad Prism (versão 5.0). Para verificar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para análise entre dois grupos foram utilizados o Test T Student para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos. Além disso, foram utilizados para determinar diferença significativa entre as médias de pelo menos três grupos analisados, os testes ANOVA seguido do de Bonferroni (dados paramétricos) e os testes de Kruskal Wallis seguido do de Dunns (dados não-paramétricos). Além destes, o teste de Grubb foi utilizado para detectar a presença de possíveis *outliers* nas amostras. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de $P \leq 0,05$.

4.10. Identificação molecular

Considerando a característica dos ovos de ancilostomídeos de possuírem uma casca delgada, propõe-se uma padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR) partindo-se diretamente do ovo, sem que haja extração prévia de DNA. Isto seria útil para conclusão de diagnóstico, uma vez que os ovos dessa família são semelhantes entre si, impossibilitando sua identificação baseada apenas em caracteres morfológicos, e impossibilitando determinar se há contaminação por fezes humanas nas amostras.

Ovos recuperados diretamente de um verme adulto fêmea foram centrifugados com água destilada para limpeza e armazenados sob refrigeração. Com auxílio de um estereomicroscópio foram contados e pipetados em um volume de 5 μL em tubos próprios para PCR e congelados até o uso. Foram testadas reações de PCR sem nenhum tratamento prévio e reações após tratamento que facilitasse a exposição do material genético dos ovos. Para isso os tubos que os continham foram colocados em banho de ultrassom por 15 minutos. Em seguida

foram submetidos a 3 ciclos de choque térmico, com congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em água quente, numa temperatura de aproximadamente 80°C (Gasser et al. 1993).

Nas reações em cadeia de polimerase foram utilizados os seguintes iniciadores capazes de amplificar a região ITS de uma variedade de nematodas da ordem Strongylida: NC5 F 5' – GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT – 3' e NC2 R 5' – TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT – 3' (Gasser & Hoste 1995; Gasser et al. 1996; Monti et al. 1998). Amplificam sequências da região intergênica de *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *A. braziliense* gerando amplicons de aproximadamente 850 pb (Clara e Silva et al. 2006).

Cada reação foi preparada para um volume final de 25 µL, sendo composta por água, tampão 1x (10mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton[®]X-100), 200µM de cada tipo de dNTP, 0,5µM de cada iniciador (NC5F e NC2R), 0,5U de Taq DNA polimerase (Phoneutria, MG, Brasil) e os ovos de ancilostomídeos. As reações foram colocadas em um termociclador (Mastercycler[®] - Eppendorf) e submetidas a 94°C por 30 segundos para desnaturação, 50°C por 30 segundos para anelamento dos iniciadores, 72°C por 45 segundos para extensão, seguidos de 39 ciclos a partir do primeiro passo. Para aplicação das amostras nos géis, primeiramente adicionou-se 2 µL de tampão da amostra (0,1% azul de bromofenol, 0,1% xilenocianol, 10% Ficoll 400) aos 10 µL dos produtos da PCR e homogeneizou-se a mistura com uma pipeta. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, a 100 V, por aproximadamente 30 minutos em TAE 0,5X (Tris-base 0,04M, EDTA 0,001M pH 8, ácido acético glacial). Após, o gel foi corado por 20 minutos em solução de brometo de etídio (0,3 µg/mL) (Sambrook 1998) e lavado em água destilada por 5 minutos. As bandas de DNA foram visualizadas por meio de um transluminador de luz UV.

Para a identificação específica foi realizada a PCR-RFLP (polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição) a partir do produto da PCR específica, utilizando a enzima *Hinf* – I, capaz de produzir perfis polimórficos de fragmentos para a região ITS de diferentes ancilostomídeos. Para digestão foram misturados 4,75 µL de água, 2,5 µL do tampão NE Buffer 2 (New England Biolabs), 0,75 µL da enzima *Hinf* – I e 3 µL do produto da PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas. O produto

gerado pelo RFLP foi visualizado em gel de poliacrilamida 6%, aplicando-se 10 μL do produto, com 2 μL do tampão de amostra 6X. A eletroforese ocorreu a 100 Volts por aproximadamente 2 horas em tampão TBE 1X. O gel de poliacrilamida foi fixado em solução contendo 10% de etanol absoluto e 0,5% de ácido acético por 15 minutos. Em seguida, foi incubado em solução de nitrato de prata por mais 15 minutos e depois lavado em água destilada. A revelação do nitrato de prata foi feita em solução contendo 3% de NaOH e 0,3% de formaldeído 37% (Santos et al. 1993).

4.11. Clonagem e sequenciamento

Com o objetivo de sequenciar um fragmento de DNA amplificado na reação de PCR realizada com os ovos de ancilostomídeos, esse fragmento foi clonado em vetor pGEM-T-easy (Promega). Para isso foi utilizado o kit pGEM[®]-T Easy Vector Systems da Promega. A ligação foi realizada adicionando em um microtubo 2,5 μL do tampão de ligação 2x, 1,5 μL do DNA de interesse (produto da PCR), 0,5 μL do vetor e 0,5 μL da enzima de ligação (T4 DNA Ligase). E o tubo incubado a 4°C, por 16 horas.

O DNA recombinante foi incubado com células bacterianas competentes XL1-Blue (Phoneutria, MG, Brasil), para transformação por choque térmico, conforme Sambrook (1989). Nesta etapa, 2 μL da ligação foram adicionados a 30 μL de células bacterianas e incubadas em gelo por 10 minutos. Em seguida, essa mistura sofreu um choque térmico sendo colocada em banho seco a 42°C por 90 segundos e colocadas no gelo novamente por 2 minutos. Em seguida foram acrescentados 500 μL do meio 2XYT ao tubo, invertendo-o para homogeneização e foram incubados a 37°C, sob agitação, por 1 hora. Após incubação, a cultura foi centrifugada a 10.000 x g por 3 minutos, descartando 400 μL do sobrenadante. Os 100 μL restantes foram homogeneizados e plaqueados em meio 2XYT sólido seletivo, contendo ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), IPTG (100mM) e X-GAL 4% (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e incubadas a 37°C, por 16 horas.

Alguns clones resultantes foram selecionados e plaqueados em uma placa numerada com 2XYT sólido seletivo e incubados durante 16 horas, a 37°C. A presença de insertos nas colônias selecionadas foi confirmada por uma PCR feita

diretamente de uma pequena amostra da colônia, ao encostar um palito de madeira estéril na colônia selecionada e colocá-lo dentro da mix para a PCR. A reação e a visualização ocorreram conforme descrito no item 4.10.

Para o crescimento das colônias de interesse em meio líquido, aquelas selecionadas foram inoculadas, com o auxílio de um palito de madeira autoclavado, em tubo falcon com 3 mL de meio de cultura líquido contendo ampicilina (100 µg/mL), sendo incubado a 37°C, sob agitação, por 16 horas.

O DNA plasmidial das amostras selecionadas foi purificado utilizando-se o kit Wizard Mini Prep da Promega. As amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e os tubos invertidos para retirada do máximo possível de meio de cultura. Foram adicionados 250 µL de solução de ressuspensão (50µM de Tris HCl, 10 µM EDTA, 100 µg/mL de RNase), os tubos foram agitados manualmente, batendo-se um tubo contra o outro, até ressuspender todo o pellet. Em seguida foram adicionados 250 µL de solução de lise. O conteúdo foi homogeneizado, invertendo o tubo até o líquido se tornar mais consistente, com aspecto turvo (lise das paredes das bactérias). Após 4 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 350 µL de solução de neutralização, invertendo os tubos 4 vezes para homogeneizar e assim formar um precipitado de proteína. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas à 14.000 x g por 4 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para coluna do kit, e os tubos foram identificados. Após a centrifugação por 1 minuto/14000 x g à temperatura ambiente, o material filtrado foi descartado, adicionando-se à coluna 750 µL de solução de lavagem com etanol, centrifugou-se por 1 minuto/14000 x g e novamente descartou-se o sobrenadante. Foram adicionados 250 µL de solução de lavagem com etanol e centrifugou-se por 2 minutos/14000 x g. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL estéril e adicionou-se 100 µL de água livre de nucleases. Após uma incubação de 3 minutos à temperatura ambiente, seguida de centrifugação por 1 minuto/14000 x g, descartou-se a coluna. O material filtrado foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop®) e, posteriormente, armazenado a -20°C em freezer.

Foi feita uma PCR com os plasmídeos extraídos, conforme item 4.10. Cada reação foi acrescida de 1 µL do material resultante da Mini Prep, para um volume

final de 25 μL . O resultado da PCR também foi visualizado após eletroforese em gel de agarose 1%, onde foram aplicados 10 μL do produto da PCR misturado a 2 μL do tampão da amostra 6x.

Para a reação de sequenciamento foram misturados em um tubo 4 μL da mix de sequenciamento (DYEnamic™ET dye terminator kit MegaBACE™, Amershan Biosciences), composta de tampão Tris-HCl, polimerase, dNTP, água e dideoxynucleotídeos, 1 μL de iniciador (forward ou reverse, 5 μM), 100-300 ng de DNA (volume máximo de 4 μL), e água Milli Q para completar o volume final de 10 μL . O volume de DNA necessário para reação de sequenciamento varia de acordo com a concentração de ácido nucléico nas amostras, obtida após quantificação em Nanodrop®.

Em seguida, os tubos contendo as misturas citadas foram colocados em um termociclador e submetidos a 95°C por 20 segundos para desnaturação, 50°C por 15 segundos para anelamento dos iniciadores, 60°C por 1 minuto para extensão, seguidos de 30 ciclos a partir do primeiro passo. Após o término da reação, os tubos foram armazenados a 4°C e mantidos envoltos por papel alumínio para evitar danos aos nucleotídeos marcados.

Para 10 μL de reação de sequenciamento, foram adicionados 1 μL de acetato de amônio (7.5M) e 2,5 volumes de etanol absoluto (100-95%), para que ocorresse a precipitação do DNA. Após vigorosa agitação no vórtex, a placa foi selada utilizando-se uma membrana e incubada por 15 minutos, na ausência de luz, à temperatura ambiente. Em seguida a placa foi centrifugada por 45 minutos/4000 x g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa, desta forma descartando todos os nucleotídeos não incorporados e iniciadores. Adicionou-se 150 μL de etanol 70% e, após, centrifugou-se por 15 minutos/4000 x g à temperatura ambiente, descartando-se novamente o sobrenadante, por inversão da placa. Em seguida foram adicionados 10 μL da solução de ressuspensão (70% de formamida, 1mM EDTA), e após vortexar vigorosamente a placa, para dissolver o pellet de DNA, foi dado um pulso para que as amostras descessem para o fundo da placa. Por fim, a placa foi envolvida em papel alumínio e armazenada no freezer a -20°C até o momento de aplicar no MegaBACE para leitura da sequência de nucleotídeos.

Após a leitura da placa no MegaBACE, os cromatogramas obtidos foram analisados pelos programas PHRED, PHRAP E CONSED (<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>) para formação de sequências consenso. As sequências obtidas foram submetidas à busca de homologias utilizando os programas BLAST N e TBLAST X DO NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Parasitos utilizados na contaminação artificial

Após concentração dos ovos e larvas de helmintos, dez lâminas de cada suspensão foram analisadas por microscopia óptica e a média dos resultados foi considerada como o valor estimado de ovos e larvas nas suspensões utilizadas para contaminação artificial das amostras. Para ovos de *A. suum* obteve-se uma média de $10,80 \pm 1,93/10 \mu\text{L}$; para os ovos de ancilostomídeos, média de $12,20 \pm 2,89/10 \mu\text{L}$; e para a suspensão com larvas de *A. ceylanicum*, média de $5,6 \pm 1,5$ em cada $10 \mu\text{L}$ (Tabela 1).

Tabela 1: Resultado das contagens em lâminas de ovos e larvas, e concentração média final, por tipo de contaminante

Lâmina	Nº de ovos de <i>A. suum</i>	Nº de ovos de ancilostomídeos	Nº de larvas de <i>A. ceylanicum</i>
1	13	14	4
2	13	16	6
3	10	9	8
4	10	11	4
5	8	8	6
6	13	11	5
7	8	16	8
8	10	15	6
9	11	10	5
10	12	12	4
Média	10,80	12,20	5,60
Desvio padrão	1,93	2,89	1,50

5.2. Padronização do método proposto

Dos quatro líquidos extratores testados (água destilada, solução 0,1% de Tween 80, solução de glicina 1M e solução de lauril sulfato de sódio 1%), a solução de glicina 1M (pH 5,5 e $d = 1,025$) foi o extator que apresentou as melhores recuperações de ovos de helmintos em alface, com média de 72,3% ($\pm 14,5$) para ovos de ancilostomídeos e 99,3% ($\pm 11,5$), para ovos de *A. suum*. A presença de espuma na solução de Tween 80 foi controlada pela adição de uma gota de antiespumante (Antifoam A), já para a solução com lauril sulfato de sódio, mesmo com adição de uma gota de antiespumante houve a formação de muita espuma, dificultando a filtração e até mesmo a leitura final, visto a formação aumentada de bolhas também na lâmina para microscopia. Como apresentado na Tabela 2, lavagem das folhas de alface com água destilada e solução de Tween 80 0,1% apresentaram médias intermediárias de recuperação, e a solução de lauril sulfato de sódio 1% apresentou a pior recuperação entre os líquidos extratores testados. Considerando a recuperação de ovos de ancilostomídeos, somente a solução de lauril sulfato de sódio apresenta diferença estatística significativa ($P < 0,05$) em relação às demais soluções. Já considerando a recuperação de ovos de *A. suum*, nenhum dos resultados apresenta diferença estatística ($P < 0,05$).

Tabela 2: Avaliação de desempenho de líquidos extratores, após contaminação artificial das amostras de alface

Líquido Extrator	Nº de ovos recuperados*	
	Ovos de ancilostomídeos	Ovos de <i>Ascaris suum</i>
Água destilada	70,67 ($\pm 12,42$)	81,67 ($\pm 24,70$)
Tween 80 0,1%	56,00 ($\pm 2,65$)	61,67 ($\pm 8,08$)
Glicina 1M	72,33 ($\pm 14,57$)	99,33 ($\pm 11,59$)
Lauril sulfato de sódio 1%	16,00 ($\pm 5,57$)	43,33 ($\pm 21,01$)

* Para contaminação artificial com 100 ovos de cada gênero. Os valores representam a média de três replicatas. Entre parênteses, valores de desvio-padrão.

Diante desse resultado e, considerando a importância do líquido extrator no isolamento de formas parasitárias em vegetais folhosos, novas análises foram feitas, em triplicata, para água destilada e solução de glicina 1M, dessa vez contaminando também com 50 larvas de *A. ceylanicum*, além dos ovos de helmintos. Os resultados podem ser observados na Tabela 3. Embora não apresentassem diferença estatística significativa ($P < 0.05$), observou-se, em geral, uma maior recuperação quando foi usada a solução de glicina 1M como líquido extrator. Assim, este foi o extrator escolhido, sendo usado nos demais testes da padronização.

Tabela 3: Avaliação de desempenho de água destilada e solução de glicina 1M como líquidos extratores, após contaminação artificial das amostras de alface

Contaminantes	Nº de contaminantes recuperados*	
	Água	Glicina
Ovos de <i>A. suum</i> (100)	69,67 ($\pm 3,79$)	85,33 ($\pm 21,94$)
Ovos de ancilostomídeos (100)	44,33 ($\pm 20,13$)	61,33 ($\pm 8,62$)
Larvas de <i>A. ceylanicum</i> (50)	50,00 ($\pm 5,67$)	48,00 ($\pm 9,53$)

* Os valores representam a média de três replicatas. Entre parênteses, valores de desvio-padrão.

Ainda na fase de extração das formas parasitárias foram testadas, em triplicata, a homogeneização manual, por 1 e 3 minutos; bem como a homogeneização mecânica em homogeneizador de amostras (Stomacher[®]), com agitação por 60 segundos, em baixa rotação. A agitação mecânica, apesar de ter sido utilizada na sua rotação mais baixa, ainda é bastante vigorosa e danifica as folhas de alface, gerando um sedimento de coloração esverdeada, dificultando a análise microscópica do sedimento. Não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre nenhum modo de agitação (Figura 2). Sendo assim, comparando-se os resultados numéricos, considerando a necessidade ou não de um equipamento para a realização das análises, e a facilidade na leitura final das lâminas, a agitação manual de 3 minutos foi escolhida como procedimento de homogeneização da amostra.

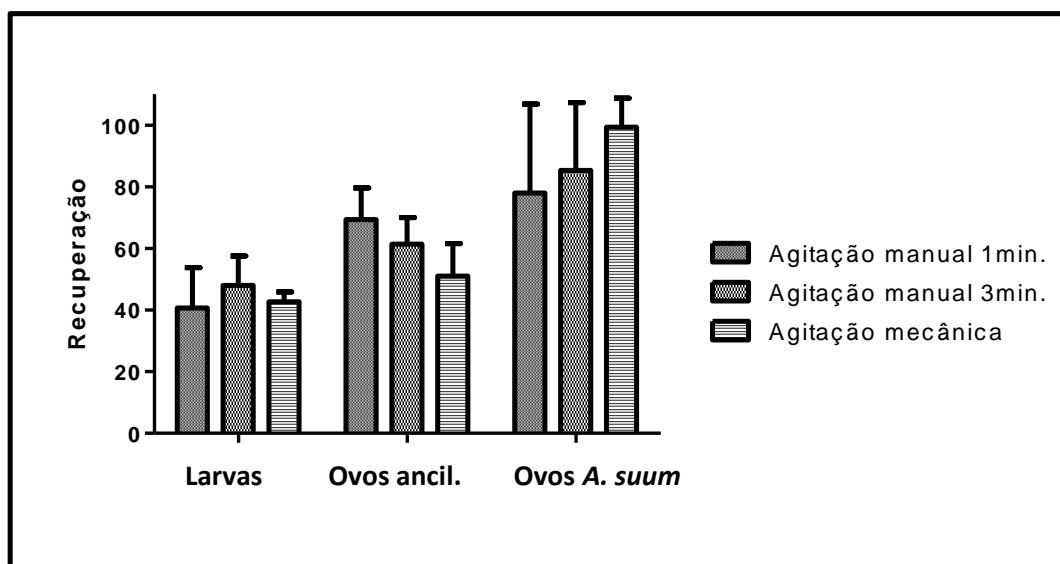


Figura 2: Recuperação em número de ovos de ancilostomídeos e *Ascaris suum*, e de larvas de *Ancylostoma ceylanicum* para os modos de agitação avaliados, após contaminação artificial das amostras de alface.

Para sedimentação dos ovos e larvas, o líquido de lavagem das folhas de alface era filtrado e deixado em repouso. Foram testados, também em triplicata, os tempos de 1, 2 e 24 horas de repouso. Conforme mostrado na Tabela 4, as maiores médias de recuperação, independente do tipo de contaminante, foram obtidas com sedimentação de 2 horas. Não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre os diferentes tempos de sedimentação. Comparando-se os resultados e considerando o tempo total de execução do método de pesquisa de parasitos em vegetais, foi escolhido o intervalo de sedimentação espontânea de 2 horas.

Tabela 4: Avaliação de desempenho de diferentes intervalos de sedimentação, após contaminação artificial das amostras de alface

Contaminantes	Nº de contaminantes recuperados*		
	1 hora	2 horas	24 horas
Ovos de <i>A. suum</i> (100)	75,67 (\pm 9,29)	93,67 (\pm 17,93)	85,33 (\pm 21,94)
Ovos de ancilostomídeos (100)	39 (\pm 6,24)	71,33 (\pm 8,5)	61,33 (\pm 8,62)
Larvas de <i>A. ceylanicum</i> (50)	56,67 (\pm 8,38)	58,67 (\pm 7,63)	48,00 (\pm 9,53)

* Os valores representam a média de três replicatas. Entre parênteses, valores de desvio-padrão.

5.3. Protocolo proposto para a detecção de ovos e larvas de helmintos em alface

Após teste e padronização das etapas envolvidas na análise parasitológica de alface, foi elaborado o seguinte protocolo de análise com aquelas mais bem sucedidas, ou seja, que resultaram nas melhores médias de recuperações das formas parasitárias, considerando-se ainda a praticidade do método:

1. Pesar alíquota(s) de 30g da amostra de alface;
2. Colocar em saco plástico de primeiro uso (24 x 34 x 0,5 cm);
3. Adicionar 200 mL da solução extratora (glicina 1M) e agitar manualmente em movimentos de vai-e-vem, durante 3 minutos;
4. Cortar uma das pontas do saco plástico, de modo que escoe o máximo de líquido possível. Filtrar este líquido por peneira (abertura de 1 mm) a fim de reter os fragmentos das folhas de alface, recolhendo-o em cálice cônico. A peneira deve ainda ser lavada com um jato de água destilada, utilizando-se uma pisseta;
5. Deixar o líquido em repouso por 2 horas, para sedimentação;
6. Retirar o sobrenadante com auxílio de uma pipeta, deixando cerca de 10 mL de sedimento;

7. Com a mesma pipeta transferir este sedimento para um tubo de centrífuga de 15 mL, lavar o cálice com 5 mL de água destilada, e adicionar ao mesmo tubo;
8. Centrifugar o tubo com o sedimento a 1120 x g por 5 minutos, descartando o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta Pasteur;
9. Montar lâminas com o sedimento final (cerca de 0,5 mL), analisando-as em microscópio óptico para detecção e identificação das formas parasitárias encontradas. Nesta etapa, pode-se adicionar lugol à lâmina, para facilitar a visualização dos ovos e larvas.

5.4. Validação do protocolo proposto para diferentes níveis de contaminação

Seguindo o protocolo especificado no tópico anterior foram analisadas amostras controle, não contaminadas artificialmente, e amostras contaminadas artificialmente, como descrito no item 4.3, divididas em cinco níveis de contaminação diferentes.

Das 10 amostras controle analisadas, apenas uma apresentou-se naturalmente contaminada, detectando-se na análise microscópica presença de 2 larvas de nematodas (não identificadas), ainda vivas. Nas demais amostras constatou-se realmente a ausência de contaminantes.

Na Figura 3 e Tabela 5 estão os resultados obtidos nos diferentes níveis de contaminação artificial (conforme Quadro 2). Considerando os níveis 1, 2, 3 e 4 de contaminação artificial, não foi detectada diferença estatística significativa independentemente do tipo de contaminante. Já para o nível 5 de contaminação, o percentual médio de recuperação de larvas de ancilostomídeos ficou abaixo dos demais ($30,0\% \pm 36,7$), diferindo significativamente da média de recuperação de ovos de *A. suum* ($P < 0,05$).

Tabela 5: Percentual médio de recuperação de ovos e larvas do método de detecção proposto. Resultados dos diferentes níveis de contaminação artificial avaliados

	Percentagem de ovos e larvas recuperados*		
	Ovos de <i>A. suum</i>	Ovos de ancilostomídeos	Larvas de <i>A. ceylanicum</i>
Nível 1	58,1 (± 12,7)	54,2 (± 8,5)	56,4 (± 7,2)
Nível 2	61,8 (± 22,1)	65,4 (± 17,4)	60,8 (± 16,4)
Nível 3	65,0 (± 15,0)	51,5 (± 13,9)	65,0 (± 34,4)
Nível 4	58,1 (± 27,6)	41,6 (± 18,3)	38,2 (± 13,8)
Nível 5	70,0 (± 21,6)	46,7 (± 30,2)	30,0 (± 36,7)

*Os valores representam as médias de dez replicatas. O desvio-padrão está representado entre parênteses.

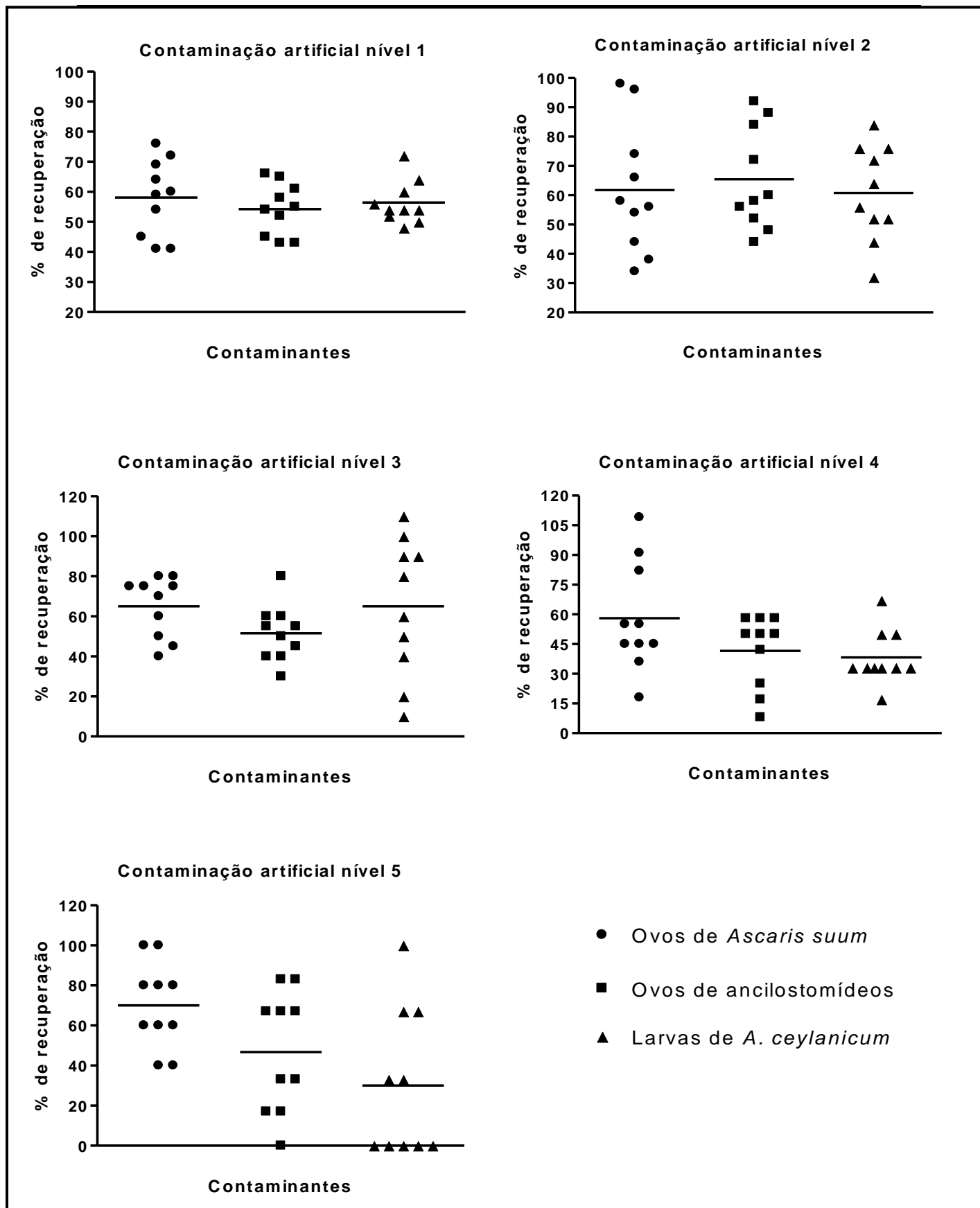


Figura 3: Dispersão, por nível de contaminação artificial, dos resultados de recuperação de ovos e larvas para o método de detecção proposto.

Uma vez que os resultados estão representados por percentuais, quando as replicatas para cada tipo de contaminante são somadas, dando um total de 50 replicatas (10 replicatas por nível x 5 níveis), observamos os melhores resultados de recuperação para ovos de *A. suum*. Para este contaminante, em 50 testes sabidamente positivos, o percentual médio de recuperação foi de 62,6% ($\pm 20,2$), não havendo nenhum resultado falso-negativo. Para ovos de *A. suum*, a sensibilidade do método foi de 100%.

Quando são considerados 50 testes de contaminação artificial com ovos de ancilostomídeos, a média de recuperação é de 51,9% ($\pm 20,0$), com apenas um falso-negativo, representando 2% do total de resultados. Já a sensibilidade do método na detecção de ovos de ancilostomídeos foi de 98%. Essa falha no resultado ocorreu para o nível mais baixo de contaminação, nível 5, quando foram adicionados 6 ovos para cada 30g de folhas de alface (0,2 ovo/g).

Já para as larvas de *A. ceylanicum*, a média de recuperação global foi de 50,0% ($\pm 27,3$), sendo constatados 5 resultados falso-negativos, representando 10% do total de resultados para esse contaminante, e uma sensibilidade de 90%. Os resultados equivocados também ocorreram para o nível mais baixo de contaminação, onde foram adicionados apenas 3 larvas do nematoda para cada 30g de alface (0,1 larva/g).

5.5. Análises interlaboratoriais

Triplicatas de amostras sem contaminação e contaminadas artificialmente com os níveis 1, 2 e 3 foram preparadas do mesmo modo que para a validação do método. Estas foram embaladas, lacradas, acondicionadas em caixas de isopor e enviadas aos laboratórios colaboradores. Nas tabelas que se seguem (Tabelas 6, 7 e 8) estão representados os percentuais de recuperação obtidos nesses testes interlaboratoriais, separados por tipo de contaminante. Devido a uma falha técnica, os resultados do Laboratório 3 para a recuperação de larvas tiveram que ser descartados. Considerando os resultados dos três laboratórios e todos os 3 níveis de contaminação empregados, em um total de 27 testes, a média de recuperação de ovos de *A. suum* foi de 52,1% ($\pm 37,9$), e de ovos de ancilostomídeos foi de 27,4%

($\pm 20,5$). Para cada tipo de contaminante, ocorreu apenas um resultado falso-negativo, o que leva a uma sensibilidade do método de 96,3%, quando aplicado por outros laboratórios. A especificidade, que representa a probabilidade do método fornecer resultado negativo quando a amostra é realmente negativa, foi de 100%, quando consideradas as 9 amostras sem contaminação artificial analisadas pelos laboratórios colaboradores. Já para as larvas de *A. ceylanicum*, foram considerados apenas 18 resultados (Laboratórios 1 e 2), com média de recuperação de 37,4% ($\pm 20,9$).

Tabela 6: Percentuais de recuperação de ovos de *Ascaris suum*, obtidos pelos laboratórios colaboradores, após contaminação artificial das amostras de alface

Laboratórios participantes	Rodadas	Não contaminado	% de ovos recuperados		
			Nível 1	Nível 2	Nível 3
	1	0	51	10	30
1	2	0	52	34	180
	3	0	43	52	50
	1	0	50	102	90
2	2	0	41	44	140
	3	0	30	0	45
	1	0	79	48	35
3	2	0	25	42	35
	3	0	41	28	30
			Média \pm dp	45,9 ($\pm 15,5$)	40,0 ($\pm 29,0$)

Tabela 7: Percentuais de recuperação de ovos de ancilostomídeos, obtidos pelos laboratórios colaboradores, após contaminação artificial das amostras de alface

Laboratórios participantes	Rodadas	Não contaminado	% de ovos recuperados		
			Nível 1	Nível 2	Nível 3
1	1	0	12	4	10
	2	0	17	8	25
	3	0	21	14	15
2	1	0	31	44	30
	2	0	33	40	85
	3	0	16	8	15
3	1	0	49	64	55
	2	0	16	56	30
	3	0	13	30	0
Média ± dp			23,1 (± 12,2)	29,8 (± 22,4)	29,4 (± 26,0)

Tabela 8: Percentuais de recuperação de larvas de *Ancylostoma ceylanicum*, obtidos pelos laboratórios colaboradores, após contaminação artificial das amostras de alface

Laboratórios participantes	Rodadas	Não contaminado	% de larvas recuperadas		
			Nível 1	Nível 2	Nível 3
1	1	0	38	16	70
	2	0	54	20	40
	3	0	50	32	50
2	1	0	26	80	10
	2	0	28	28	50
	3	0	14	8	60
Média ± dp			35,0 (± 15,3)	30,7 (± 25,6)	46,7 (± 20,6)

5.6. Aplicação do método proposto a outra matriz

Na Tabela 9 estão representados os percentuais médios de recuperação de ovos e larvas de helmintos em rúcula. Foram analisadas cinco amostras de rúcula minimamente processadas, de 30g cada, sem contaminação artificial, e dessas amostras apenas uma apresentou-se naturalmente contaminada com 27 rotíferos (*Rotifera*), 1 fragmento de inseto e 1 inseto inteiro (Figura 4), mas não apresentou contaminação por helmintos.

Considerando as quatro replicatas para cada nível de contaminação, bem como todos os cinco níveis, para um total de 20 amostras de rúcula, artificialmente contaminadas, o percentual médio de recuperação de ovos de *Ascaris suum* em rúcula foi de 44,3% (± 18,0), de ovos de ancilostomídeos foi de 51,2% (± 20,4), e a recuperação média de larvas de *A. ceylanicum* foi de 53,1% (± 23,5). Para os ovos de helmintos utilizados, o método apresentou sensibilidade de 100%, visto que nenhum resultado foi falso-negativo. Já para as larvas do nematoda testado, uma amostra apresentou resultado falso-negativo (5%), levando a uma sensibilidade de

95% para tal contaminante. Este resultado equivocado ocorreu para o nível mais baixo de contaminação, nível 5, onde foram adicionadas 3 larvas às folhas do vegetal (0,1 larva/g).

Tabela 9: Percentuais médios de recuperação de ovos e larvas em amostras de rúcula, após contaminação artificial

Percentagem de ovos e larvas recuperados em rúcula*			
	Ovos de <i>A. suum</i>	Ovos de ancilostomídeos	Larvas de <i>A. ceylanicum</i>
Nível 1	53,7 (± 17,4)	58,2 (± 14,8)	57,0 (± 7,7)
Nível 2	38,0 (± 18,4)	33,0 (± 8,4)	45,0 (± 8,9)
Nível 3	51,2 (± 18,0)	65,0 (± 28,6)	72,5 (± 25,0)
Nível 4	33,7 (± 18,5)	41,7 (± 11,8)	41,5 (± 9,8)
Nível 5	45,0 (± 19,1)	58,0 (± 21,4)	49,7 (± 43,0)

*Os valores representam as médias de quatro replicatas. O desvio-padrão está representado entre parênteses.

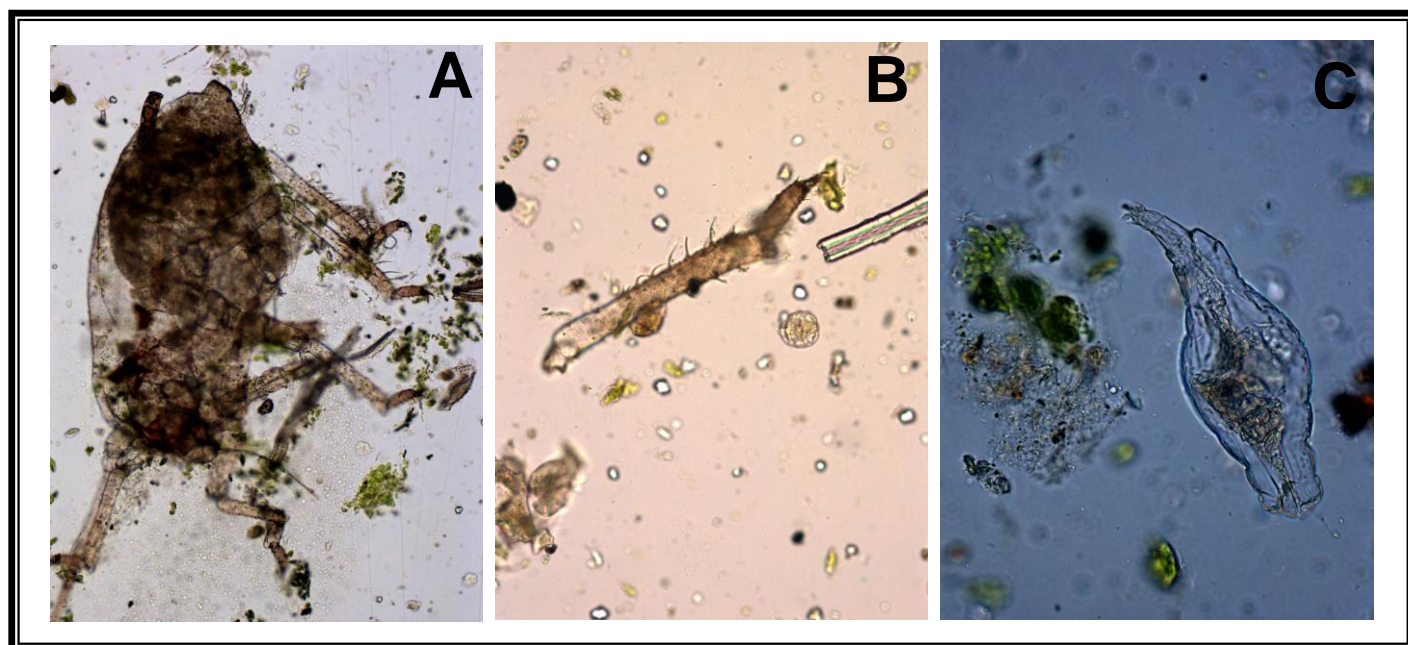


Figura 4: Contaminantes não parasitários presentes em amostra de rúcula. (A) inseto inteiro (100x); (B) fragmento de inseto (200x); (C) rotífero (400x).

Não houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) quando se comparou a recuperação do método para ovos de ancilostomídeos e larvas de *A. ceylanicum*, independente do tipo de vegetal, alface ou rúcula. Porém, considerando o percentual de recuperação do método para ovos de *A. suum*, existe diferença significativa ($P < 0,05$). A Figura 5 demonstra essa comparação.

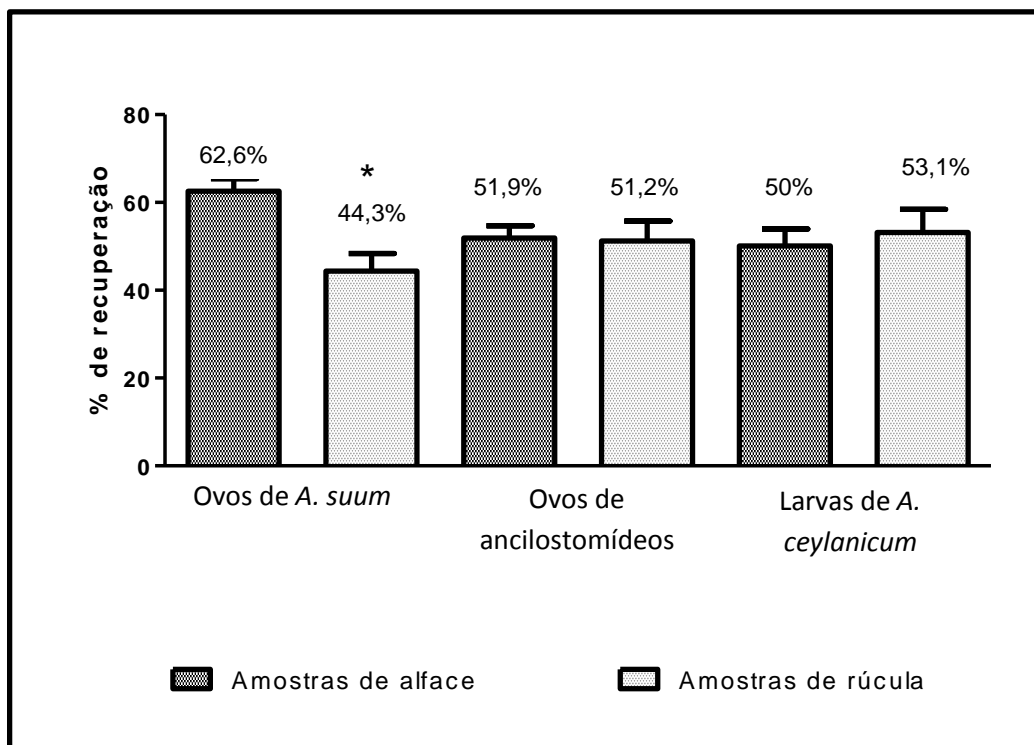


Figura 5: Comparação entre os percentuais médios de recuperação de ovos de *A. suum*, ovos de ancilostomídeos e de larvas de *A. ceylanicum* obtidos pelo método proposto quando empregado para amostras de alface e de rúcula.

5.7. Identificação molecular

A PCR não amplificou o material genético quando realizada diretamente com os ovos de ancilostomídeos íntegros, sem nenhum tratamento prévio. Porém, amplificou satisfatoriamente a região que compreende as sequências para ITS-1, 5,8S e ITS-2 de *A. caninum*, com o tamanho esperado de 850 pb quando, antes da reação, procedeu-se com ultrassonicação, por 15 minutos, dos ovos acondicionados em tubos para PCR, seguida de três ciclos de choque térmico, colocando-se os tubos em contato com nitrogênio líquido e, imediatamente, água aquecida a aproximadamente 80°C. Porém, os iniciadores utilizados nesta reação, NC2 e NC5, também foram capazes de amplificar um material genético contaminante, gerando um fragmento de DNA de aproximadamente 600 pb (Figura 6).

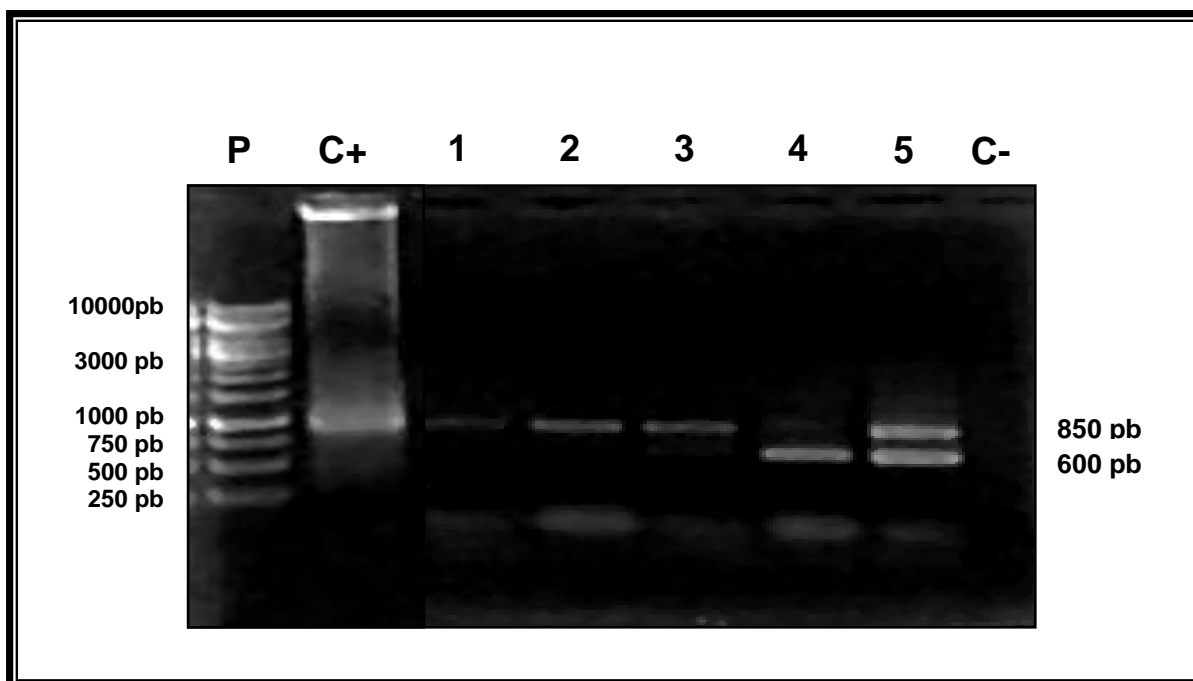


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1% apresentando os resultados da PCR para pequena quantidade de ovos de *Ancylostoma caninum*. PM: Padrão molecular 1kb (Fermentas); C+: Mini-prep de *A. caninum*; Linhas 1-5 representam, respectivamente: 4, 3, 7, 9 e 10 ovos de *A. caninum*; C-: controle negativo.

Visando uma possível identificação da origem do fragmento de DNA de 600 pb amplificado juntamente com a sequência correspondente aos ancilostomídeos, esse fragmento foi clonado e foi realizada uma PCR diretamente das colônias bacterianas para verificar quais clones realmente possuíam o inserto. As colônias denominadas 30 e 48 foram amplificadas satisfatoriamente. Este resultado é apresentado na Figura 7.

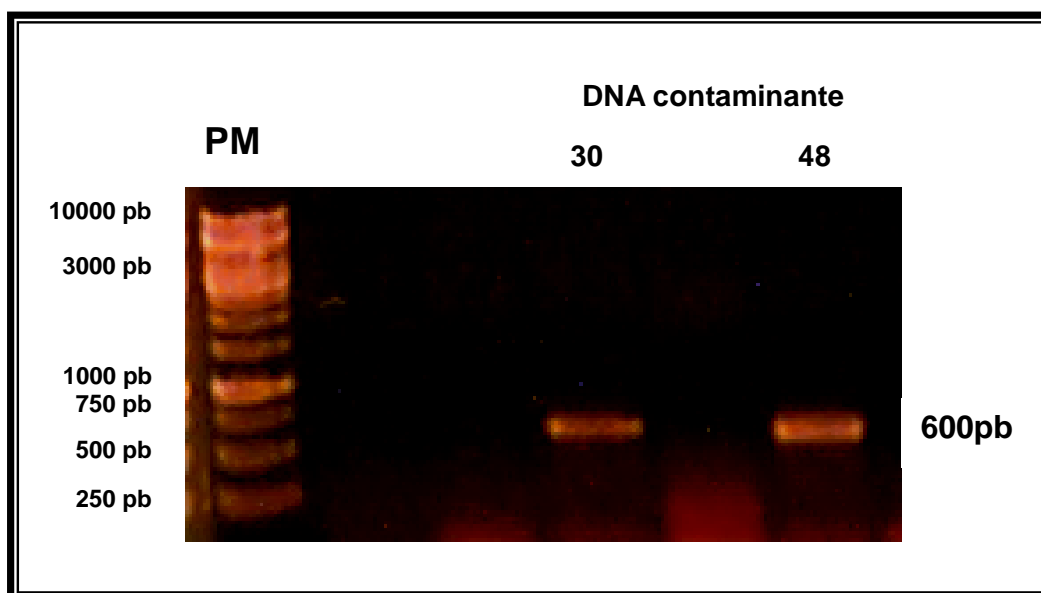


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1% apresentando os resultados da PCR de colônias provenientes de transformações com plasmídeos recombinantes contendo material genético contaminante que foi amplificado. PM: 1kb (Fermentas); DNA contaminante amplificado das colônias 30 e 48.

Foi realizada uma mini prep de DNA plasmidial das colônias 30 e 48 e o material resultante foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop[®]). A amostra 30 apresentou concentração média de DNA de 131 ng/ μ L, sendo utilizados 2 μ L da mesma para a reação de sequenciamento. Já a amostra 48 apresentou concentração de cerca 85 ng/ μ L, utilizando-se 3,5 μ L da amostra para o sequenciamento.

Os resultados do sequenciamento foram submetidos ao programa Blast N, para a busca de homologia com alguma sequência nucleotídica já depositada no GenBank. A amostra 48, com 551 pb, apresentou 99% de homologia com fungos do gênero *Dothideomycete* sp (EU680480.1). Para este gênero foram usadas como referência a sequência parcial do gene que codifica para região 18S do RNA ribossomal, as sequências completas das regiões ITS 1 e ITS 2, e região 5.8S do RNA ribossomal, além da sequência parcial do gene que codifica para região 28S do RNA ribossomal. Já a amostra 30, com 517 pb, apresentou homologia de 97% com o clone f3Fc77 de um fungo não cultivável (GU721780.1). Como referências foram

utilizadas as mesmas regiões anteriormente citadas (ver resultado do Blast N no Anexo).

Para complementar os resultados também foi feita uma PCR-RFLP. Observou-se que a enzima *Hinf-I*, além de gerar perfis polimórficos para as espécies do gênero *Ancylostoma*, também foi capaz de digerir o fragmento de DNA contaminante, que foi identificado como sendo de um fungo, gerando um perfil também diferenciado (Figura 8).

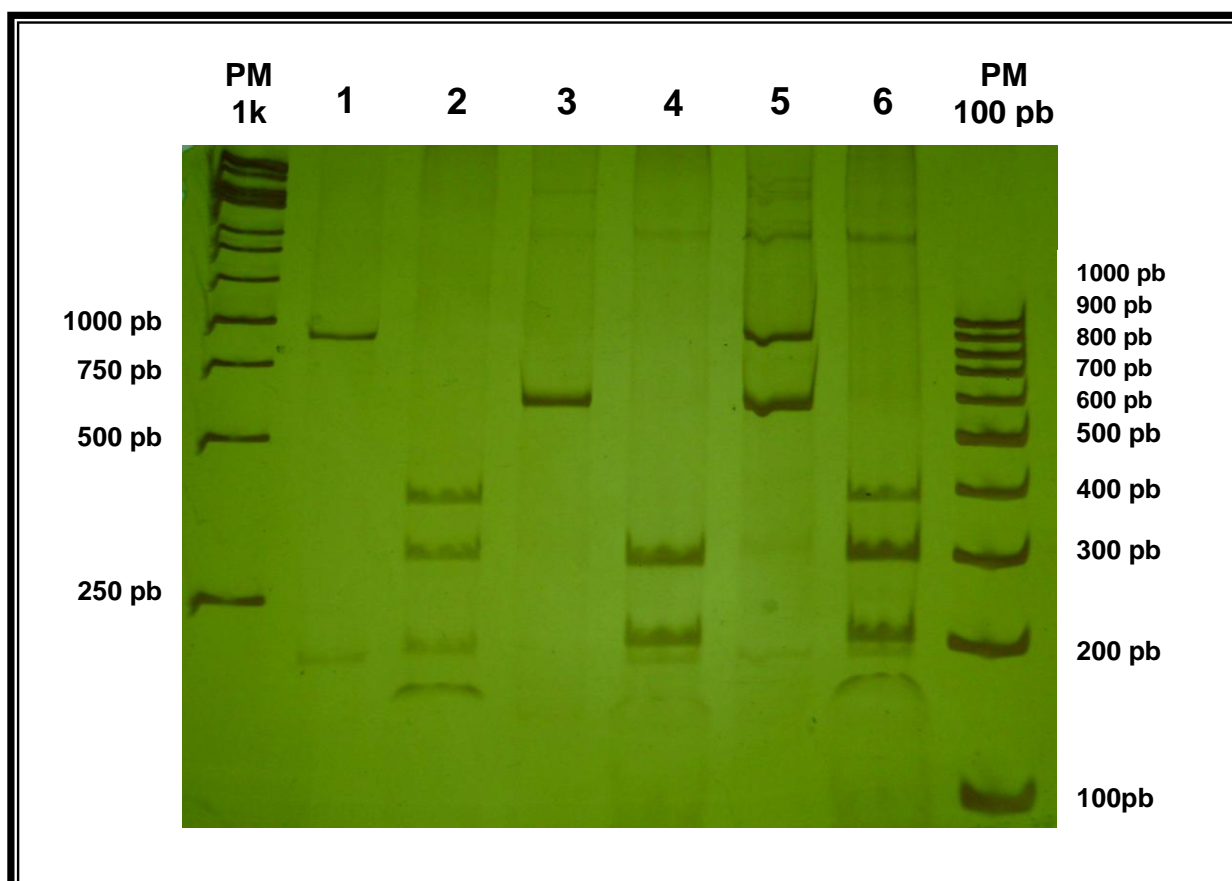


Figura 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% do RFLP da região ITS com a enzima *Hinf-I* para diferenciar ancilostomídeos e fungo contaminante. PM: 1kb (Fermentas); 1- DNA de *A. caninum* sem digerir (850 pb); 2- DNA de *A. caninum* digerido; 3- DNA de fungo contaminante sem digerir (600pb); 4- DNA de fungo contaminante digerido; 5- DNA de ambos sem digerir; 6- DNA de ambos digerido; PM: 100pb (Fermentas).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os riscos potenciais à saúde relacionados com protozoários e helmintos parasitos receberam maior atenção devido aos surtos de doenças transmitidas por alimentos, ocorridos durante a segunda metade do século XX. Globalização no comércio de alimentos, preferências por pratos crus e mal cozidos, facilidade das viagens internacionais e aumento do número de indivíduos imunocomprometidos são alguns dos fatores atribuídos ao aumento das infecções parasitárias de origem alimentar. Dentre as razões para subnotificação estão a falta de reconhecimento dos potenciais efeitos da contaminação parasitária sobre a saúde pública e a ausência de protocolos de triagem desses patógenos para rotina (Orlandi et al. 2002).

Nesse contexto o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um método para detecção de parasitos contaminantes em vegetais, mais especificamente, usando a alface como modelo para a padronização do método. Ao testarmos, separadamente, variações das etapas mais críticas do método, observamos que algumas influenciam de maneira mais contundente os resultados, enquanto outras levam a alterações pouco significativas.

No caso do líquido extrator, o uso de solução de lauril sulfato de sódio 1% gerou os piores percentuais de recuperação, pois favorecia a formação de grande quantidade de espuma e de bolhas nas lâminas de leitura, mesmo quando adicionado um antiespumante à solução. Controversamente, Bier (1991) concluiu que o uso de uma mistura de detergentes aniônico e neutro aumenta a recuperação quando comparados com o uso de água ou solução fisiológica para lavar os vegetais. O modo de lavagem do vegetal pode ter interferido neste resultado, uma vez que no método aqui proposto foi feita por agitação manual e nesse trabalho citado era feita por banho em ultrassom. Cook e colaboradores (2006a), avaliando diversos líquidos extratores para oocistos de *Cryptosporidium parvum* em alface, também observou melhores resultados quando utilizada a solução de glicina 1M.

Quanto ao modo de extração das formas parasitárias da superfície das hortaliças, são utilizadas formas bastante diversas, desde repouso da amostra numa solução extratora (Al-Megrin 2010) até mesmo a lavagem de folha por folha com um pincel (Oliveira & Germano 1992). Testamos a agitação manual e mecânica, sendo

observado que esta última, por ser muito vigorosa, danificava mais as folhas de alface, gerando um sedimento de coloração esverdeada, com maior quantidade de fragmentos vegetais, dificultando a análise microscópica. Além disso, a falta de Stomacher[®] não se constituiria em impedimento para a realização da análise na rotina dos laboratórios.

O pH da solução de lavagem também influencia a coloração do sedimento final. Cook e colaboradores (2006a) observaram que a diminuição do pH abaixo de 4 aumentava a lise nas células de alface, gerando um líquido de lavagem mais colorido, dificultando a identificação final dos oocistos de *C. parvum*. Neste sentido, a solução de glicina 1M também foi escolhida para compor o protocolo para detecção deste protozoário, uma vez que, dentre outras características favoráveis, possui pH 5,5.

Barnabé e colaboradores (2010), comparando a sensibilidade de técnicas parasitológicas em amostras de alface, rúcula e agrião, investigadas pelas técnicas de Hoffman, Pons e Janer (HPJ) e Faust, observaram que a primeira, baseada na sedimentação espontânea, foi mais eficaz na detecção de ovos e larvas de helmintos, e cistos de protozoários nos vegetais estudados.

Utilizando a sedimentação espontânea como forma de concentração dos parasitos para a metodologia proposta, observou-se que, para formas mais densas aqui representadas pelos ovos de *Ascaris suum* e larvas, não houve grande diferença de recuperação entre os diferentes intervalos de repouso para sedimentação. Já para formas leves, tais como os ovos de ancilostomídeos, para se obter recuperações razoáveis, são necessárias pelo menos 2 horas de sedimentação.

Considerando todos os níveis de contaminação ($n = 50$), o método mostrou-se mais eficaz na recuperação de ovos de *Ascaris suum* ($62,6\% \pm 20,2$), seguida pela recuperação dos ovos de ancilostomídeos ($51,9\% \pm 20,0$) e larvas de *A. ceylanicum* ($50,0\% \pm 27,3$). Tendo em vista que o resultado final da análise parasitológica em vegetais é expresso por presença ou ausência de parasitos e que as contaminações realizadas estavam representadas nas faixas de 3,33 ovos/g a 0,2 ovo/g e 1,66 larva/g a 0,1 larva/g, os percentuais médios de recuperação observados para o método aqui proposto é considerado satisfatório, apesar dos valores de desvio-

padrão. Bier, em 1991, apresentou o método utilizado pelo FDA e avaliou seu percentual de recuperação. Quando folhas de repolho foram contaminadas com 1ovo/g e 10 ovos/g, a média de recuperação de ovos de *Ascaris* sp ou *Trichuris* sp foi de apenas 10%.

Segundo Cook e colaboradores (2006a), um método padrão de detecção de microrganismos deve ser relativamente simples, robusto, reprodutível, rápido, confiável e realista. Avaliando tais parâmetros é que foram escolhidas as etapas deste método de detecção de ovos e larvas de helmintos em alface. Nesse sentido o método é mais simples e rápido que o proposto pelo FDA. Sua robustez pode ser comprovada pelos resultados quando o protocolo foi aplicado a uma outra matriz, no caso rúcula, e ainda assim se mantiveram os percentuais médios de recuperação de ovos de ancilostomídeos e larvas, não variando significativamente dos resultados alcançados para amostras de alface. Somente o percentual de recuperação para os ovos de *A. suum* apresentou diferença estatística significativa quando comparado àquele obtido para alface. Apesar de uma recuperação de ovos de *A. suum* mais baixa que para as amostras de alface, não houve prejuízo para a sensibilidade do método quando aplicado às amostras de rúcula, uma vez que não ocorreram resultados falso-negativos para este contaminante.

Apesar de o percentual médio de recuperação obtido pelos laboratórios colaboradores terem ficado abaixo do percentual de recuperação obtido pelo laboratório de origem, os resultados das análises interlaboratoriais são considerados satisfatórios. Das 27 amostras contaminadas e, portanto, sabidamente positivas para ovos de parasitos, apenas dois resultados foram dados equivocadamente, quando considerou-se que não havia ovos de ancilostomídeos em uma dada amostra e ausência de ovos de *A. suum* em outra. O método demonstrou ser capaz de uma detecção qualitativa confiável de ovos de *A. suum* e de ancilostomídeos, e de larvas de *A. ceylanicum* em alface. Cook e colaboradores (2006a), padronizando método de detecção de *C. parvum* em alface (n = 30) obtiveram recuperação média de $59 \pm 12\%$. Entretanto, quando da validação do método com ensaios interlaboratoriais, a recuperação média entre os 8 laboratórios colaboradores foi de apenas 30,4%. Porém, treinamentos e a prática continuada de execução do método tendem a aumentar sua sensibilidade (Cook et al. 2006b).

Além dos ovos de helmintos, as fases larvárias que se desenvolvem no ambiente também são frequentemente relatadas como contaminantes de vegetais folhosos. Porém, não foi encontrado na literatura estudo sobre o desempenho dos métodos de detecção de parasitos em vegetais para tal contaminante. Barrantes e colaboradores (2011) analisaram 60 amostras de alface obtidas de mercados em Lima, Peru, e dessas, 38 (63,3%) apresentaram contaminação por larvas filarióides e rabditóides de *Strongyloides* spp.

Neste trabalho foi constatada a presença de larvas de nematodas vivas em uma amostra-controle de alface e de outras sujidades como fragmentos de inseto e rotíferos em uma amostra-controle de rúcula, ambas minimamente processadas. Dado relevante, uma vez que as hortaliças são vendidas prontas para o consumo e deveriam ter sido higienizadas previamente. Pelo fato de alface e rúcula serem comumente consumidas cruas em saladas, o risco de contaminação torna-se ainda mais preocupante. Tais achados sugerem alguma falha no processo de higienização das hortaliças. Silva e colaboradores (2007), avaliando a qualidade parasitológica de 52 amostras de vegetais minimamente processados, observou contaminação por oocistos de *Eimeria* spp em 8 amostras (15,3%), indicando que houve alguma contaminação com fezes animais. Sujidades como fragmentos de insetos e ácaros jovens também foram encontrados.

O fato das larvas encontradas na amostra de alface não terem sido identificadas não invalida o resultado, visto que também denotam falha no processo de higienização, uma vez que, mesmo que fossem de vida livre, deveriam ser eliminadas com o processo de lavagem das hortaliças. Além disso, as larvas de vida livre, apesar de não constituírem um risco direto para a saúde humana, devem ser consideradas com atenção, haja vista a possibilidade de carregarem bactérias patogênicas para os alimentos. Segundo levantamento bibliográfico feito por Kenney e colaboradores (2006), *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* já foram relatados por serem ingeridos por *Caenorhabditis elegans*, um nematoda de vida livre, encontrado em solos de regiões temperadas.

Supõe-se que a cutícula intacta de vermes vivos ou mortos de *C. elegans*, e possivelmente de outros gêneros também, funcione como uma barreira física para

proteger as células de bactérias presentes no intestino contra produtos químicos de limpeza e sanitizantes aplicados em processamentos de frutas e vegetais crus, tais como tratamento com cloro, uma vez que os patógenos não são eliminados. A liberação de bactérias pela defecação dos nematodas de vida livre pode ser um mecanismo pelo qual esses vermes podem atuar como vetores no transporte de bactérias do solo para a superfície do produto (Caldwell et al. 2003; Kenney et al. 2004; Kenney et al. 2006).

Os resultados de Kenney e colaboradores (2005) indicam que *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 podem sobreviver por longo período de tempo após serem ingeridas pelo verme. O grupo demonstrou pela primeira vez que *C. elegans* infectado por tais patógenos pode transmiti-los para a progênie, como resultado da excreção de células viáveis no ambiente e ingestão destas pelos vermes juvenis.

Nematodas de vida livre também podem atuar na transmissão de *Cryptosporidium parvum*, importante patógeno associado a surtos de doença humana pelo consumo de água e vegetais frescos. Em um estudo para determinar se *C. elegans* poderia servir como um potencial vetor mecânico para transporte de *C. parvum* e *Cyclospora cayetanensis* em ambientes agrícolas, 70-85% dos vermes ingeriram entre 0 e 500 oocistos de *C. parvum* após 1 e 2 horas de incubação. Já os oocistos de *C. cayetanensis* não foram ingeridos por *C. elegans*. Também foi observado que oocistos intactos e outros vazios foram excretados pelos nematodas, concluindo que adultos de *C. elegans* podem ingerir e excretar oocistos de *C. parvum*, e os nematodas contendo oocistos são capazes de infectar ratos, mas não parecem proteger os oocistos contra a dessecação extrema quando incubados a 23°C por um dia ou mais (Huamanchay et al. 2004).

Essas e outras observações fornecem perspectivas para o papel que *C. elegans* e talvez de outros nematodas de vida livre podem desempenhar no reforço da sobrevivência e persistência de patógenos, com consequente aumento potencial de risco de contaminação de frutas e legumes (Kenney et al. 2005; Anderson et al. 2006).

A presença de protozoários de vida livre em vegetais folhosos e seu potencial sequestro de bactérias entéricas em vesículas indicam que eles também podem desempenhar um papel importante na ecologia de patógenos humanos. Em

Tetrahymena sp, um ciliado de vida livre, já foi observada a capacidade de formação de vesículas que continham *E. coli* O157:H7 e *S. enterica*, tanto em experimentos *in vitro*, como nas folhas (Gourabathini et al. 2008).

Métodos moleculares têm sido amplamente utilizados para a diferenciação de espécies parasitas morfologicamente semelhantes e para examinar a genética de populações do parasita. O DNA utilizado por esses métodos moleculares é geralmente extraído de vermes adultos ou pelo menos de larvas multicelulares (Carlsgart et al. 2009). A maioria dos trabalhos que objetivam identificação de ovos de helmintos, seja a partir de fezes ou outras matrizes como solo e água, procede com uma extração prévia de DNA (exemplos: Hodgkinson et al. 2005; Mochizuki et al. 2006; Gatcombe et al. 2010; Gomes et al. 2010; Khouja et al. 2010). Tendo em vista a elevada temperatura envolvida na PCR, 94°C para desnaturação da fita dupla de DNA, e que hipoteticamente seria suficiente para ruptura da casca dos ovos de helmintos, expondo o material genético, testamos tal reação com ovos de ancilostomídeos íntegros. Porém, sem nenhum tratamento prévio não obtivemos resultado satisfatório, demonstrando que as camadas que compõem a casca dos ovos de ancilostomídeos são resistentes à esta temperatura. Com isso, partimos para um tratamento baseado em ultrassonicação e choque térmico, como descrito por Gasser e colaboradores (1993) para um único ovo de *Trichostrongylus retortaeformis*, o qual foi bem sucedido.

Carlsgart e colaboradores (2009) relatam a dificuldade de se obter sucesso na PCR sem extração de DNA em ovos com casca mais espessa e resistente, como aqueles de *Ascaris* sp. Neste trabalho apresentam um método sensível para amplificar o material genético de um único ovo de *Ascaris suum* não embrionado utilizando como tratamento prévio o esmagamento mecânico dos ovos com pistilo de vidro estéril, seguido da PCR diretamente sobre o material bruto, sem qualquer purificação adicional. Contrariamente, também testaram ciclos de choque térmico (99,9 a -176°C, seis vezes), mas não obtiveram qualquer resultado positivo em 25 reações.

Já foi demonstrado que o DNA recuperado a partir de uma lâmina de microscópio de uma amostra de alimento é suficiente para ser amplificado. A aplicação direta de métodos de caracterização molecular do material recuperado de

lâminas contribui com a saúde pública, visto a importância de se detectar diferentes espécies de parasitos em alimentos ou água (Ripabelli et al. 2004).

A reação de PCR utilizando os iniciadores NC2 e NC5, capazes de amplificar as regiões ITS-1, 5.8S e ITS-2 de *Ancylostoma ceylanicum* e *A. caninum*, também seria viável na detecção de contaminações com parasitos humanos. *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale* são as duas espécies mais importantes na causa da ancilostomíase no ser humano. Tais iniciadores geram amplicons para *N. americanus* e *A. duodenale* de 1100 pb e 870 bp, respectivamente (Monti et al. 1998).

Sendo assim, para *Necator americanus*, o comprimento do produto de amplificação pode ser considerado um marcador genético para distinguir essa espécie das demais espécies de ancilostomídeos. No entanto, o produto gerado por *A. duodenale* usando o conjunto de iniciadores NC5-NC2 foi semelhante em tamanho ao de uma variedade de outros nematodas Strongylidae. Significando que o tamanho do amplicon por si só pode não ser um marcador genético confiável para a identificação espécie-específica (Monti et al. 1998).

Nestes e em outros casos, tal como a amplificação de fragmentos de DNA contaminantes, os resultados podem ser confirmados pela técnica de PCR-RFLP. No presente estudo observou-se que a enzima *Hinf-I*, além de gerar perfis polimórficos para as espécies do gênero *Ancylostoma*, também foi capaz de digerir o fragmento de DNA contaminante, que foi identificado como sendo de um fungo, gerando perfil também diferenciado (Figura 8). Esta técnica utiliza as diferenças na sequência de DNA que é cortado por uma enzima de restrição, gerando perfis polimórficos. A análise por RFLP de genes de nematodas tem sido amplamente utilizada, sendo especialmente útil na diferenciação de espécies que, em alguma fase do ciclo de vida, são indistinguíveis morfologicamente, como os ancilostomídeos (Hawdon 1996; Clara e Silva et al. 2006), *Ascaris suum* e *A. lumbricoides* (Zhu et al. 1999; Arizono et al. 2010), e *Trichuris suis* e *Trichuris trichiura* (Cutillas et al. 2009).

O conjunto de iniciadores NC5-NC2 é conhecido por amplificar o DNA ribossomal de diferentes espécies de nematodas Strongylidae, mas não do hospedeiro vertebrado ou DNA fecal (Monti et al. 1998). Após sequenciamento e

busca de homologia com alguma sequência nucleotídica já depositada no GenBank, a amostra 48 (DNA contaminante amplificado) apresentou homologia de 99% com fungos do gênero *Dothideomycete* sp. Tais fungos são encontrados como patógenos de plantas vivas e também como saprófitas degradando a celulose e outros complexos de hidratos de carbono em matéria vegetal morta ou parcialmente digerida na serrapilheira ou esterco (Schoch et al. 2006). Tendo em vista que os parasitos usados para o fornecimento dos ovos foram obtidos das fezes de seus hospedeiros, é de se esperar que esses fungos estivessem presentes nas fezes dos animais.

Uma vez que as regiões de anelamento dos iniciadores (rDNA 18S e rDNA 28S, Figura 1) são muito conservadas, mesmo para diferentes espécies, houve amplificação para os contaminantes, entretanto, produzindo um fragmento de menor tamanho. Esse fragmento contaminante serviu como um controle de discriminação para os produtos amplificados, uma vez que produz fragmentos de tamanhos diferentes quando submetido ao tratamento com enzimas de restrição.

O método de detecção de ovos e larvas de helmintos em vegetais, aqui apresentado, poderá vir a ser utilizado pelas agências de vigilância sanitária nas diversas regiões do país, melhorando a prática de fiscalização dos alimentos minimamente processados e daqueles adquiridos “*in natura*”. Os métodos moleculares foram realizados neste trabalho apenas de maneira ilustrativa, visto que não houve a comparação e diferenciação entre diferentes espécies. Provavelmente, não serão utilizados na rotina dos laboratórios de microscopia, mas demonstram a possibilidade de serem aplicados como suplementares, auxiliando na identificação específica de parasitos.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1- Os melhores resultados do método proposto foram obtidos com o emprego de solução de glicina 1M como líquido extrator, agitação manual por 3 minutos como modo de lavagem, e sedimentação espontânea por 2 horas, como forma de concentração dos ovos e larvas de helmintos.

2- O método proposto apresentou recuperação média de ovos e larvas de helmintos entre 50-62% e sensibilidade mínima de 90%.

3- Os resultados preliminares para o emprego do método com folhas de rúcula, apontam para a possibilidade da metodologia proposta ser útil não somente para amostras de alface, como também para outros vegetais folhosos.

4- Embora as porcentagens de recuperação obtidas pelos laboratórios colaboradores tenham sido inferiores às encontradas pelo nosso grupo, estas apresentaram ainda alta sensibilidade.

5- Para a amplificação do DNA a partir de ovos de ancilostomídeos, é necessário algum tratamento prévio desses ovos. Somente a temperatura mais alta envolvida na PCR (94°C), não foi capaz de romper a casca dos ovos de ancilostomídeos testados.

6- Os resultados obtidos sugerem a potencial aplicação da metodologia proposta na rotina de laboratórios de microscopia de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas 2005. NBR ISO/IEC 17025: 2005: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro.

Al-Binali AM, Bello CS, El-Selwy k, Abdulla SE 2006. The prevalence of parasites in commonly used leafy vegetables in South Western Saudi Arabia. *Saudi Med J* 27: 613-616.

Al-Megrin WAI 2010. Prevalence of intestinal parasites in leafy vegetables in Riyadh, Saudi Arabia. *International Journal of Zoological Research* 6: 190-195.

Amoah P, Drechsel P, Abaidoo RC, Klutse A 2007. Effectiveness of common and improved sanitary washing methods in selected cities of West Africa for the reduction of coliform bacteria and helminth eggs on vegetables. *Trop Med Int Health* 12 (suppl. 2): 40-50.

Amoah P, Drechsel P, Abaidoo RC, Ntow WJ 2006. Pesticide and Pathogen Contamination of Vegetables in Ghana's Urban Markets. *Arch Environ Contam Toxicol* 50: 1-6.

Anderson GL, Kenney SJ, Millner PD, Beuchat LR, Williams PL 2006. Shedding of foodborne pathogens by *Caenorhabditis elegans* in compost-amended and unamended soil. *Food Microbiol* 23: 146-153.

Arbos KA, Freitas RJS, Stertz SC, Carvalho LA 2010. Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. *Ciênc Tecnol Aliment* 30 (Suppl. 1): 215-220.

Arizono N, Yoshimura Y, Tohzaka N, Yamada M, Tegoshi T, Onishi K, Uchikawa R 2010. Ascariasis in Japan: Is Pig-Derived *Ascaris* Infecting Humans? *Jpn J Infect Dis* 63 (6): 447-448.

Avcioğlu H, Soykan E, Tarakci U 2011. Control of Helminth Contamination of Raw Vegetables. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11 (2): 189- 191.

Barnabé AS, Ferraz RRN, Pincinato EC, Gomes RCF, Galleguillos TGB, Cerqueira MZ, Soares EGL, Lage PS, Araújo CX, Szamszoryk M, Massara CL 2010. Análisis comparativo de los métodos para la detección de parásitos en las hortalizas para el consumo humano. *Rev Cubana Med Trop* 62 (1): 21-7.

- Barrantes CG, Bambarén AG, Guillén A 2011. Larvas de *Strongyloides* spp. en Lechugas Obtenidas en Mercados de Lima. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 28 (1): 156-66.
- Bier JW 1991. Isolation of Parasites on Fruits and Vegetables. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*: 144-145.
- Blagg W, Schloegel EL, Mansur NSG, Kholaf GI 1955. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *Am J Trop Med Hyg* 4: 23-28.
- Blumenthal UJ, Mara DD, Peasey A, Ruiz-Palacios G, Stott R 2000. Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. *Bull World Health Organ* 78 (9): 1104-1116.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 02/06/2003.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 175, de 08 de julho de 2003. Aprova o Regulamento Técnico de Avaliação de Materiais Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10/07/2003.
- Caldwell KN, Adler BB, Anderson GL, Williams PL, Beuchat LR 2003. Ingestion of *Salmonella enterica* Serotype Poona by a Free-Living Nematode, *Caenorhabditis elegans*, and Protection Against Inactivation by Produce Sanitizers. *Appl Environ Microbiol* 69 (7): 4103-4110.
- Cantos GA, Soares B, Maliska C, Gick D 2004. Estruturas Parasitárias Encontradas em Hortaliças Comercializadas em Florianópolis, Santa Catarina. *NewsLab* 66: 154-163.
- Carlsgart J, Roepstorff A, Nejsun P 2009. Multiplex PCR on single unembryonated *Ascaris* (roundworm) eggs. *Parasitol Res* 4: 939-943.

Carvalho OS, Guerra HL, Campos YR, Caldeira RL, Massara CL 2002. Prevalência de helmintos intestinais em três mesorregiões do Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 597-600.

Ceasa/MG. Ofertas de Produtos. Mercado: CEASA-MG Unidade Grande BH. Produto: Alface. [Acesso em: 6 fev. 2011]. Disponível em: http://minas.ceasa.mg.gov.br/scriptcase/tmp/sc_pdf_20110206114906_367_ofertas_medio_prd.pdf/.

Clara e Silva LM, Miranda RRC, Hudson HA, Rabelo EML 2006. Differential diagnosis of dog hookworms based on PCR-RFLP from the ITS region of their rDNA. *Vet Parasitol* 140: 373-377.

Coelho LMPS, Oliveira SM, Milman MHSA, Karasawa KA, Santos RP 2001. Detecção de formas transmissíveis de enteroparasitas na água e nas hortaliças consumidas em comunidades escolares de Sorocaba, São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 479-482.

Cook N, Paton CA, Wilkinson N, Nichols RAB, Barker K, Smith HV 2006a. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. *Int J Food Microbiol* 109: 215-221.

Cook N, Paton CA, Wilkinson N, Nichols RAB, Barker K, Smith HV 2006b. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 2: Validation. *Int J Food Microbiol* 109: 222-228.

Cooper PJ, Ayre G, Martin C, Rizzo JA, Ponte EV, Cruz AA 2008. Geohelminth infections: a review of the role of IgE and assessment of potential risks of anti-IgE treatment. *Allergy* 63: 409-417.

Crea-Minas. Agricultura familiar garante produção do Cinturão Verde de BH. *Revista vértice*: 2009 [Acesso em 28 jan. 2011]. Disponível em: http://www.crea-mg.org.br/03_Gab_GCM_publicaes/Vertice_01.pdf.

- Cutillas C, Callejón R, Rojas M de, Tewes B, Ubeda JM, Ariza C, Guevara DC 2009. *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Trop* 111: 299-307.
- Damen JG, Banwat EB, Egah DZ, Allanana JA 2007. Parasitic contamination of vegetables in Jos, Nigeria. *Ann Afr Med* 6: 115-118.
- Dauchet L, Amouyel P, Hercberg S, Dallongeville J 2006. Fruit and Vegetable Consumption and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *J Nutr* 136: 2588-2593.
- de Silva NR, Brooker S, Hotez PJ, Montresor A, Engels D, Savioli L 2003. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol* 19 (12): 547-551.
- Do O, Alli OA, Ogunleye VF, Olusoga-Ogbolu FF, Olaosun I 2009. The presence of intestinal parasites in selected vegetables from open markets in south western Nigeria. *Afr J Med Med Sci* 38: 319-324.
- Ensink JHJ, Hoek WVD, Mukhtar M, Tahir Z, Amerasinghe FP 2005. High risk of hookworm infection among wastewater farmers in Pakistan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 809-818.
- Ensink JHJ, Mahmood T, Dalsgaard A 2007. Wastewater-irrigated vegetables: market handling versus irrigation water quality. *Trop Med Int Health* 12 (suppl. 2): 2-7.
- Esrey SA, Gough J, Rapaport D, Sawyer R, Simpson-Hébert M, Vargas J, Winblad U 1998. Ecological Sanitation. Swedish International Development Cooperation Agency, Stockholm, 92pp.
- Eyre H, Kahn R, Robertson RM 2004. Preventing Cancer, Cardiovascular Disease, and Diabetes: A Common Agenda for the American Cancer Society, the American Diabetes Association, and the American Heart Association. *CA Cancer J Clin* 54: 190-207.

- Falavigna LM, Freitas CBR, Melo GC, Nishi L, Araújo SM, Falavigna-Guilherme AL 2005. Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. *Parasitol Latinoam* 60: 144-149.
- Ferreira MU, Ferreira CS, Monteiro CA 2000. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). *Rev Saude Publica* 34 (suppl. 6): 73-82.
- Freitas AA, Kwiatkowski A, Nunes SC, Simonelli SM, Sangioni LA 2004. Avaliação parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em feiras livres e supermercados do município de Campo Mourão, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 26: 381-384.
- Freitas EI, Lemos AA, Marin VA 2006. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. *Cien Saude Colet* 11: 1073-1083.
- Gasser RB, Chilton NB, Hoste H, Beveridge I 1993. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminthes. *Nucleic Acids Res* 21: 2525-2526.
- Gasser RB, Hoste H 1995. Genetic markers for closely-related parasitic nematodes. *Mol Cell Probes* 9: 315-320.
- Gasser RB, Stewart LE, Speare R 1996. Genetic markers in ribosomal DNA for hookworm identification. *Acta Trop* 62: 15-21.
- Gatcombe RR, Jothikumar N, Dangoudoubiyam S, Kazacos KR, Hill VR 2010. Evaluation of a molecular beacon real-time PCR assay for detection of *Baylisascaris procyonis* in different soil types and water samples. *Parasitol Res* 106: 499-504.
- Gomes LI, Marques LHS, Enk MJ, de Oliveira MC, Coelho PMZ, Rabello A 2010. Development and Evaluation of a Sensitive PCR-ELISA System for Detection of *Schistosoma* Infection in Feces. *PLoS Negl Trop Dis* 4 (4): e664.
- Gourabathini P, Brandl MT, Redding KS, Gunderson JH, Berk SG 2008. Interactions between Food-Borne Pathogens and Protozoa Isolated from Lettuce and Spinach. *Appl Environ Microbiol* 74 (8): 2518-2525.

- Guilherme ALF, Araújo SM, Falavigna DLM, Pupulim ART, Dias MLGG, Oliveira HS, Maroco E, Fukushigue Y 1999. Prevalência de enteroparasitas em horticultores e hortaliças da Feira do Produtor de Maringá, Paraná. *Rev Soc Bras Med Trop* 32 (4): 405-411.
- Guimarães AM, Alves EGL, Figueiredo HCP, Costa GM, Rodrigues LS 2003. Frequência de enteroparasitas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em Lavras, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 36 (5): 621-623.
- Gupta S, Satpati S, Nayek S, Garai D 2010. Effect of wastewater irrigation on vegetables in relation to bioaccumulation of heavy metals and biochemical changes. *Environ Monit Assess* 165:169-177.
- Hawdon JM 1996. Differentiation between the Human Hookworms *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* Using PCR-RFLP. *J Parasitol* 82 (4): 642-647.
- Heiss C, Keen CL, Kelm M 2010. Flavanols and cardiovascular disease prevention. *Eur Heart J* 31: 2583-2592.
- Hodgkinson JE, Freeman KL, Lichtenfels JR, Palfreman S, Love S, Matthews JB 2005. Identification of strongyle eggs from anthelmintic-treated horses using a PCR-ELISA based on intergenic DNA sequences. *Parasitol Res* 95: 287–292.
- Huamanchay O, Genzlinger L, Iglesias M, Ortega YR 2004. Ingestion of *Cryptosporidium* oocysts by *Caenorhabditis elegans*. *J Parasitol* 90 (5): 1176-1178.
- Idowu OA, Rowland SA 2006. Oral fecal parasites and personal hygiene of food handlers in Abeokuta, Nigeria. *Afr Health Sci* 6 (3): 160-164.
- Jan FA, Ishaq M, Khan S, Ihsanullah I, Ahmad I, Shakirullah M 2010. A comparative study of human health risks via consumption of food crops grown on wastewater irrigated soil (Peshawar) and relatively clean water irrigated soil (lower Dir). *J Hazard Mater* 179: 612-621.
- Jensen PKM, Phuc PD, Konradsen F, Klank LT, Dalsgaard A 2009. Survival of *Ascaris* eggs and hygienic quality of human excreta in Vietnamese composting latrines. *Environ Health* 8: 57.

- Kenney SJ, Anderson GL, Williams PL, Millner PD, Beuchat LR 2004. Effectiveness of cleaners and sanitizers in killing *Salmonella* Newport in the gut of a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*. *J Food Prot* 67 (10): 2151-2157.
- Kenney SJ, Anderson GL, Williams PL, Millner PD, Beuchat LR 2005. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Newport, and *Salmonella* Poona in the gut of a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*, and transmission to progeny and uninfected nematodes. *Int J Food Microbiol* 101: 227-236.
- Kenney SJ, Anderson GL, Williams PL, Millner PD, Beuchat LR 2006. Migration of *Caenorhabditis elegans* to manure and manure compost and potential for transport of *Salmonella* Newport to fruits and vegetables. *Int J Food Microbiol* 106: 61-68.
- Keraita B, Konradsen F, Drechsel P, Abaidoo RC 2007. Reducing microbial contamination on wastewater-irrigated lettuce by cessation of irrigation before harvesting. *Trop Med Int Health* 12 (suppl. 2): 8-14.
- Khouja LBA, Cama V, Xiao L 2010. Parasitic contamination in wastewater and sludge samples in Tunisia using three different detection techniques. *Parasitol Res* 107: 109-116.
- Lichtenstein AH, Brands M, Franch HA, Harris WS, Lefevre M, Horn LV, Winston M, Wylife-Rosett J 2006. Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006: a Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 114: 82-86.
- Maistro LC 2001. Alface minimamente processada: uma revisão. *Rev Nutr* 14: 219-224.
- Mariwah S, Drangert J 2011. Community perceptions of human excreta as fertilizer in peri-urban agriculture in Ghana. *Waste Manag Res* 0: 1-8.
- Massara CL, Ferreira RS, Andrade LD, Guerra HL, Carvalho OS 2003. Effects of detergents and desinfectants on the development of *Ascaris lumbricoides* eggs. *Cad Saude Publica* 19: 335-40.

- Menezes AI, Lima VMP, Freitas MTS, Rocha MO, Silva EF, Dolabella SS 2008. Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50: 57-59.
- Mesquita VCL, Serra CMB, Bastos OMP, Uchoa CMA 1999. Contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 363-366.
- Mochizuki R, Endoh D, Onuma M, Fukumoto S 2006. PCR-based Species-Specific Amplification of ITS of *Mecistocirrus digitatus* and ITS Application in Identification of GI Nematode Eggs in Bovine Faeces. *J Vet Med Sci* 68: 345-351.
- Monti JR, Chilton NB, Bao-Zhen Q, Gasser RB 1998. Specific amplification of *Necator americanus* or *Ancylostoma duodenale* DNA by PCR using markers in ITS-1 rDNA, and its implications. *Mol Cell Probes* 12: 71-78.
- Moraes RG 1948. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidose no Brasil. *Rev Serv Esp Saúde Pública* 1: 507-624.
- Nolla AC, Cantos GA 2005. Relação entre a ocorrência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos e aspectos epidemiológicos em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Cad Saude Publica* 21: 641-645.
- Norman FF, Ayala AP, Pérez-Molina JA, Monge-Maillo B, Zamarrón P, López-Vélez R 2010. Neglected Tropical Diseases outside the Tropics. *PLoS Negl Trop Dis* 4 (7): e762.
- Nyarango RM, Aloo PA, Kabiru EW, Nyanchongi BO 2008. The risk of pathogenic intestinal parasite infections in Kisii Municipality, Kenya. *BMC Public Health* 8: 237.
- Oliveira CAF, Germano PML 1992. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil, I - Pesquisa de helmintos. *Rev Saude Publica* 26 (4): 283-289.
- Oliveira MA, Ribeiro EGA, Bergamini AMM, Martinis ECP 2010. Quantification of *Listeria monocytogenes* in minimally processed leafy vegetables using a combined

method based on enrichment and 16S rRNA real-time PCR. *Food Microbiol* 27: 19–23.

Ono LM, Zulpo DL, Peretti J, Garcia JL 2005. Ocorrência de helmintos e protozoários em hortaliças cruas comercializadas no município de Guarapuava, Paraná, Brasil. *Semina Ciênc Agrar* 26: 543-546.

Orlandi PA, Chu DT, Bier JW, Jackson GJ 2002. Parasites and the Food Supply. *Food Technol* 56 (4): 72-81.

Ortega CD, Ogawa NY, Rocha MS, Blasbalg R, Caiado AHM, Warmbrand G, Cerri GG 2010. Helminthic Diseases in the Abdomen: An Epidemiologic and Radiologic. *RadioGraphics* 30: 253-267.

Paula P, Rodrigues PSS, Tórtora JCO, Uchôa CMA, Farage S 2003. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurantes self-service, de Niterói, RJ. *Rev Soc Bras Med Trop* 36 (4): 535-537.

Pecson BM, Barrios JA, Johnson DR, Nelson KL 2006. A Real-Time PCR Method for Quantifying Viable *Ascaris* Eggs Using the First Internally Transcribed Spacer Region of Ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 72: 7864-7872.

Pedron FA, Dalmolin RSD, Azevedo AC, Kaminski J 2004. Solos urbanos. *Cienc Rural* 34: 1647-1653.

Pérez-Molina JA, Díaz-Menéndez M, Pérez-Ayala A, Ferrere F, Monje B, Norman F, López-Vélez R 2010. Tratamiento de las enfermedades causadas por parásitos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28: 44-59.

Ripabelli G, Leone A, Sammarco ML, Fanelli I, Grasso GM, Mclauchlin J 2004. Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Experimentally Contaminated Lettuce Using Filtration, Immunomagnetic Separation, Light Microscopy, and PCR. *Foodborne Pathog Dis* 1 (4): 216-222.

Rocha RS, Silva JG, Peixoto SV, Caldeira RL, Firmo JOA, Carvalho OS, Katz N 2000. Avaliação da esquistossomose e de outras parasitoses intestinais, em

escolares do município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 431-436.

Roque FC, Borges FK, Signori LGH, Chazan M, Pigatto T, Coser TA, Mezzari A, Wiebbelling AMP 2005. Parasitos Intestinais: Prevalência em Escolas da Periferia de Porto Alegre – RS. *NewsLab* 69: 152-162.

Saeed HA, Hamid HH 2010. Bacteriological and Parasitological Assessment of Food Handlers in the Omdurman Area of Sudan. *J Microbiol Immunol Infect* 43: 70-73.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 7.87p.

Santana LRR, Carvalho RDS, Leite CC, Alcântara LM, Oliveira TWS, Rodrigues BM 2006. Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. *Cienc Tecnol Aliment* 26: 264-269.

Santos FR, Pena SDJ, Epplen JT 1993. Genetic and population study of a y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet* 90: 655-656.

Schoch CL, Shoemaker RA, Seifert KA, Hambleton S, Spatafora JW, Crous PW 2006. A multigene phylogeny of the *Dothideomycetes* using four nuclear loci. *Mycologia*, 98 (6): 1041-1052.

Scott CA, Faruqui NI, Raschid-Sally L 2004. Wastewater use in irrigated agriculture: management challenges in developing countries. *CAB International* 1-10.

Shahnazi M, Jafari-Sabet M 2010. Prevalence of Parasitic Contamination of Raw Vegetables in Villages of Qazvin Province, Iran. *Foodborne Pathog Dis* 7: 1025-1030.

Silva CG, Santos HA 2001. Ocorrência de parasitoses intestinais da área de abrangência do Centro de Saúde Cícero Idelfonso da Regional Oeste da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 1: 1-11.

Silva CGM, Andradre SAC, Stamford TLM 2005. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and others parasites in vegetables consumed in natura, Recife, Brazil. *Cien Saude Colet* 10: 63-69.

Silva SRP, Verdin SEF, Pereira DC, Schatkoski AM, Rott MB, Corção G 2007. Microbiological Quality of Minimally Processed Vegetables Sold in Porto Alegre, Brazil. *Braz J Microbiol* 38: 594-598.

Simões MPB, Pisani B, Marques EGL, Prandi MAG, Martini MH, Chiarini PF, Antunes JLF, Nogueira AP 2001. Hygienic-sanitary conditions of vegetables and irrigation water from kitchen gardens in the municipality of Campinas, SP. *Braz J Microbiol* 32: 331-333.

Singh, Balbir 1997. Molecular Methods for Diagnosis and Epidemiological Studies of Parasitic Infections. *Int J Parasitol* 27 (10): 1135-1145.

Soares B, Cantos G 2006. Detecção de estruturas parasitárias em hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, SC, Brasil. *Rev Bras Cienc Farm* 42: 455-460.

Soares B, Cantos GA 2005. Qualidade parasitológica e condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Rev Bras Epidemiol* 8: 377-384.

Soler ET 2006. Validation of Qualitative Analytical Methods, Tese de Doutorado, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, 285pp.

Strauss M 2000. Human Waste (Excreta and Wastewater) Reuse. In Bibliography on Urban Agriculture, Duebendorf, Switzerland, p. 1-31.

Takayanagui OM, Capuano DM, Oliveira CAD, Bergamini AMM, Okino MHT, Castro e Silva AAMC, Oliveira MA, Ribeiro EGA, Takayanagui AMM 2007. Avaliação da contaminação de hortas produtoras de verduras após a implantação do sistema de fiscalização em Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop* 40 (2): 239-241.

Takayanagui OM, Febrônio LHP, Bergamini AMM, Okino MHT, Silva AAMC, Santiago R, Capuano DM, Oliveira MA, Takayanagui AMM 2000. Fiscalização de

hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 169-174.

Takayanagui OM, Oliveira CD, Bergamini AMM, Capuano DM, Okino MHT, Febrônio LHP, Silva AAMC, Oliveira MA, Ribeiro EGA, Takayanagui AMM 2001. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 37-41.

Takizawa MGMH, Falavigna DLM, Gomes ML 2009. Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Paraná, southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51: 31-35.

Trang DT, Molback K, Cam PD, Dalsgaard A 2007. Helminth infections among people using wastewater and human excreta in peri-urban agriculture and aquaculture in Hanoi, Vietnam. *Trop Med Int Health* 12 (suppl. 2): 82-90.

Traviezo-Valles L, Dávila J, Rodríguez R, Perdomo O, Pérez J 2004. Contaminación enteroparasitaria de lechugas del estado Lara, Venezuela. *Parasitol Latinoam* 59: 167-170.

Uga S, Hoa NT, Noda S, Moji K, Cong L, Aoki Y, Rai SK, Fujimaki Y 2009. Parasite egg contamination of vegetables from a suburban market in Hanoi, Vietnam. *Nepal Med Coll J* 11: 75-80.

Xue ZJ, Liu SQ, Liu YL, Yan YL 2011. Health risk assessment of heavy metals for edible parts of vegetables grown in sewage-irrigated soils in suburbs of Baoding City, China. *Environ Monit Assess*.

World Health Organization 2003. The World Health Report 2003: Shaping the future. World Health Organization, Geneva, 193pp.

World Health Organization 2006. Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater - Vol. 2: Wastewater Use in Agriculture. World Health Organization, Geneva, 196pp.

Yong T, Lee L, Sim S, Lee J, Min D, Chai J, Eom KS, Sohn W, Lee S, Rim H 2007. Differential diagnosis of *Trichostrongylus* and hookworm eggs via PCR using ITS-1 sequence. *Korean J Parasitol* 45: 69-74.

Zhu X, Chilton NB, Jacobs DE, Boes J, Gasser RB 1999. Characterisation of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* 29: 469-478.

ANEXO

9. ANEXO

- **Sequências consenso:**

Amostra 30

TTAGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATC
CGAGGTCAACCTTAGAAATGGGGTTGTTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCCTTTAGC
GAATAGTTTCCACAACGCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGGTCGATTTGAGGCACGC
GGCGGACCGCGTTGCCAACACCAAGCAGGGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACA
GGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACT
GAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACC
AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACA
AAAGGTTTGTGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAA
AAGACAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGG

Amostra 48

TTAGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATC
CGAGGTCAACCTTAGAAATGGGGTTGTTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCCTTTAGC
GAATAGTTTCCACGACGCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGGTCGATTTGAGGCACGC
GGCGGACCGCGTTGCCAATACCAAGCGAGGCTTGAGTGGTCAAATGACGCTCGAACA
GGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTAC
TGAATTCTGCAATTCACACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAAC
CAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTTTAATTTATTAATTAATTTACTCAGACTGCAAAGTTAC
ACAAGAGTTTGAAGTGTCCACCCGGAGCCCCCGCCGAAGGCAGGGTCGCCCCGGAG
GCAACAGAGTCAGACAACAAGGGTTATGAACATCCCGGTGGTAAAACCGGGGTCCT
CGTAATGATCCTTCCGCAGAAT

- Alignments

Amostra 30 (517 pb):

```
>|gb|GU721780.1| Uncultured fungus clone f3Fc77 18S ribosomal RNA gene, partial
sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA
gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence;
and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=598
```

```
Score = 863 bits (467), Expect = 0.0
Identities = 495/508 (97%), Gaps = 4/508 (1%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 12 TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACC 71
|
Sbjct 598 TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACC 539

Query 72 TTAGAAATGGGGTTGTTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCCTTTAGCGAATAGTTTCCA 131
|
Sbjct 538 TTAGAAATGGGGTTGTTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCCTTTAGCGAATAGTTTCCA 479

Query 132 CAACGCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGGTCGATTTGAGGCACGCGGGCGGACCGCGTTG 191
|
Sbjct 478 CAACGCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGGTCGATTTGAGGCACGCGGGCGGACCGCGGATG 419

Query 192 CCCAACACCAAGC-AGGGCTTGAG-GGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGG 249
|
Sbjct 418 CCCAATACCAAGCGAGG-CTTGAGTGGTG-AAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCCGG 361

Query 250 AATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA 309
|
Sbjct 360 AATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA 301

Query 310 CACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT 369
|
Sbjct 300 CACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT 241

Query 370 GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTGTGTTT 429
|
Sbjct 240 GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT 181

Query 430 GTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACAAGGGTGAAT 489
|
Sbjct 180 GTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACAAGGGTGAAT 121

Query 490 AATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGG 517
|
Sbjct 120 AATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGG 93
```

Amostra 48 (551 pb):

> [gb|EU680480.1](#) Dothideomycete sp. 7408 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,
 and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S
 ribosomal RNA gene, partial sequence
 Length=684

Score = 985 bits (533), Expect = 0.0
 Identities = 541/545 (99%), Gaps = 0/545 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 4      GTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGA 63
            |||
Sbjct 584    GTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGA 525

Query 64     GGTCAACCTTAGAAATGGGGTTGTTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCCCTTTAGCGAAT 123
            |||
Sbjct 524    GGTCAACCTTAGAAATGGGGTTGTTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCCCTTTAGCGAAT 465

Query 124    AGTTTCCACGACGCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGGTTCGATTTGAGGCACGCGGCGGA 183
            |||
Sbjct 464    AGTTTCCACAACGCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGGTTCGATTTGAGGCACGCGGCGGA 405

Query 184    CCGCGTTGCCCAATACCAAGCGAGGCTTGAGTGGTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCC 243
            |||
Sbjct 404    CCGCGTTGCCCAATACCAAGCGAGGCTTGAGTGGTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCC 345

Query 244    CCCCAGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACCTGAATTCTGC 303
            |||
Sbjct 344    CCCCAGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACCTGAATTCTGC 285

Query 304    AATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCC 363
            |||
Sbjct 284    AATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCC 225

Query 364    GTTGTAAAAAGTTTTAATTTATTAATTAATTTACTCAGACTGCAAAGTTACACAAGAGTT 423
            |||
Sbjct 224    GTTGTAAAAAGTTTTAATTTATTAATTAATTTACTCAGACTGCAAAGTTACGCAAGAGTT 165

Query 424    TGAAGTGTCCACCCGGAGCCCCCGCCGAAGGCAGGGTCGCCCCGGAGGCAACAGAGTCA 483
            |||
Sbjct 164    TGAAGTGTCCACCCGGAGCCCCCGCCGAAGGCAGGGTCGCCCCGGAGGCAACAGAGTCA 105

Query 484    GACAACAAAAGGTTATGAACATCCCGGTGGTAAAACCGGGTCACTCGTAATGATCCTTC 543
            |||
Sbjct 104    GACAACAAAAGGTTATGAACATCCCGGTGGTAAAACCGGGTCACTTGTAATGATCCCTC 45

Query 544    CGCAG 548
            |||
Sbjct 44     CGCAG 40
  
```