



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Natássia Carolina Esposito Rosa Lago

**Investigação molecular, caracterização genotípica de
parasitas patogênicos e distribuição espacial por
geoprocessamento de amostras humanas e ambientais
do município de Bauru-SP.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em Doenças
Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

**Botucatu
2020**

Natássia Carolina Esposito Rosa Lago

Investigação molecular, caracterização genotípica de parasitas patogênicos e distribuição espacial por geoprocessamento em amostras humanas e ambientais do município de Bauru-SP.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lago, Natássia Carolina Esposito Rosa.

Investigação molecular, caracterização genotípica de parasitas patogênicos e distribuição espacial por geoprocessamento em amostras humanas e ambientais do município de Bauru-SP / Natássia Carolina Esposito Rosa Lago. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Virgínia Bodelão Richini Pereira
Capes: 40101096

1. Água de irrigação - Qualidade. 2. Intestinos - Parasitos.
3. Doenças parasitárias. 4. Diagnóstico molecular. 5. Hortaliças.

Palavras-chave: Água de irrigação; Diagnóstico molecular; Doenças parasitárias; Hortaliças; Seres humanos.

Dedicatória

Dedico com muito carinho este trabalho a minha família. Àqueles que sempre me impulsionaram a crescer e conquistar. Obrigada por serem meu porto seguro, por todo amor, incentivo e carinho. Sem vocês não chegaria até aqui.

Agradecimentos

À Deus por tudo que tenho conquistado, pela força diária para enfrentar as lutas da vida, pela sabedoria e saúde.

À minha família que é tudo para mim, Gesner, Mônica, Samara, Vó Linda e Derli, por sempre estarem ao meu lado, pela paciência e compreensão durante esta fase da minha vida.

À minha orientadora Dra. Virgínia, que sempre me proporcionou oportunidades para crescer profissionalmente. Obrigada por toda ajuda, paciência e apoio durante esses anos.

Aos amigos que fiz no laboratório do IAL Ághata, Laís, Alessandra, Bárbara, Thiago, Lívia e Wesley pela amizade, apoio. E em especial, agradeço minhas amigas Débora, Lorena e Amanda que foram essenciais para a realização deste trabalho, mas também pelo suporte em muitos dias difíceis, sem vocês não teria conseguido.

À Thainá Bertozzo, minha amiga de mestrado, por toda ajuda e pela linda amizade. À Dra. Érica e Dra. Ana Paula do Laboratório de Parasitologia do IB – Unesp Botucatu por toda contribuição após anos de experiência no assunto.

A todos os funcionários e colegas do Instituto Adolfo Lutz de Bauru que de alguma forma contribuíram neste trabalho, em especial a Milena, Chico, Val e Marco por toda ajuda e disposição. Agradeço também a Laís Anversa pelas contribuições.

A todos os produtores rurais e voluntários que escolheram participar desta pesquisa, o meu muito obrigada. Desejo muito sucesso a este importante trabalho, a agricultura, em nosso município.

À meus professores componentes da banca de defesa: professor Armando Castello Branco Junior e professora Simone Baldini Lucheis, agradeço grandemente a disposição em contribuir para que este trabalho se tornasse ainda melhor. Guardarei vocês sempre em meus pensamentos com muito carinho.

Agradeço grandemente aos docentes e discentes do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por todos os ensinamentos, suporte e amizade.

À Seção técnica de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e à biblioteca da Universidade Estadual Paulista - UNESP –Botucatu, pelos serviços prestados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES, pelo suporte financeiro referente à bolsa de mestrado (de março a junho de 2018).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela bolsa de mestrado (processo n° 2018/01411-8) e auxílio à pesquisa (processo n° 2018/16021-0).

“Se quiser ter o arco-íris, primeiro terá que enfrentar a chuva.”

- A culpa é das Estrelas.

Resumo

Resumo

As infecções intestinais parasitárias são um problema mundial. Parasitas veiculados em água e alimentos como podem ser provenientes da falta de higiene durante o manuseio dos alimentos, contaminação ambiental por material fecal, irrigação de cultivos agrícolas com águas poluídas ou fossas sépticas precárias, situações comuns em países como o Brasil. Tais questões, colaboram para ocorrência de surtos por água e alimentos na população. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de parasitas importantes em saúde pública em hortaliças e água de irrigação de propriedades do município de Bauru, São Paulo; bem como, nas fezes e nas mãos de manipuladores dos cultivos. As amostras foram coletadas de cinco propriedades do município de Bauru, sendo uma localizada em área urbana e quatro em área rural. Foram obtidas 33 amostras de água de irrigação, 62 de hortaliças, 31 das mãos e dez fecais dos manipuladores. Todas as amostras foram submetidas a análise molecular e as águas de irrigação submetidas ainda a análise microbiológica. Na análise microbiológica foi detectado coliformes totais e *E. coli* em três propriedades. Na análise molecular, o parasita mais prevalente em água de irrigação e hortaliça foi *Cyclospora cayetanensis*. *Taenia* spp. foi detectada em uma hortaliça e *Giardia* spp. foi mais prevalente nas amostras humanas. Não foi detectado *Toxoplasma gondii*. As amostras de água de irrigação apresentaram maior quantidade de amostras positivas. Atividades de educação em saúde foram desenvolvidas durante as coletas com os proprietários a partir dos resultados das análises e dados obtidos de questionário epidemiológico aplicado, com o objetivo de auxiliar na identificação de riscos ao cultivo. Este estudo mostrou que hortaliças são veículos de transmissão de parasitas intestinais sendo um risco para os consumidores locais e da região, principalmente as crianças uma vez que três das cinco propriedades destinam o produto para merenda escolar. A presença de animais livres circulantes nos cultivos foi uma situação comum nos locais e pode ter contribuído para a disseminação de parasitas zoonóticos. O geoprocessamento contribuiu para uma melhor visualização da distribuição desses parasitas nos cultivos. Atividades de educação com foco na qualidade da água e higiene das mãos dos trabalhadores podem evitar contaminação das hortaliças, refletindo na qualidade do alimento cultivado.

Palavras-chave: Água de irrigação, diagnóstico molecular, doenças parasitárias, hortaliças, seres humanos.

Abstract

Abstract

Parasitic intestinal infections are a worldwide problem. Parasites carried in water and food as they may come from the lack of hygiene during food handling, environmental contamination by fecal material, irrigation of agricultural crops with polluted water or precarious septic tanks, common situations in countries like Brazil. Such issues contribute to the occurrence of outbreaks by water and food in the population. Thus, the objective of this work was to investigate the presence of important parasites in public health in vegetables and irrigation water on rural properties in the municipality of Bauru, São Paulo; as well as in the feces and in the hands of crop handlers. The samples were collected from five rural properties in the municipality of Bauru, one of them located in an urban area and another four in a rural area. Were collected 33 samples of irrigation water, 62 of vegetables, 31 of hands and 10 fecal samples from handlers. All samples were subjected to molecular analysis and irrigation water was also subjected to microbiological analysis. In this microbiological analysis, total coliforms were detected at high rates and *E. coli* in three of the properties. In molecular analysis, the parasite most prevalent in the analysis and most common in irrigation water and vegetables was *Cyclospora cayetanensis*. *Taenia* spp. was detected in one greenery. *Giardia* spp. was most detected in human samples. *Toxoplasma gondii* was not detected. The samples of irrigation water had a greater quantity of positive samples. Health education activities were developed during the collections with the owners based on the results of the analyzes and data obtained from an applied epidemiological questionnaire, with the objective of helping to identify risks to cultivation. This study showed that vegetables are vehicles for the transmission of intestinal parasites, being a risk for local and regional consumers, especially children, since three of the five properties use the product for school meals. The presence of free animals in the crops was a common situation in the places, which can contribute to the spread of zoonotic parasites. Geoprocessing contributes to a better visualization of the distribution of these parasites in the study areas. Education activities focusing on water quality and hand hygiene of rural workers can be to avoid contamination of vegetables, reflecting on the quality of food grown

Keywords: Irrigation water; Molecular diagnosis; Parasitic diseases; Vegetables; Human beings.

Sumário

1.	Revisão da literatura.....	7
2.	Objetivos.....	14
3.	Material e Métodos.....	16
3.1.	Autorizações.....	16
3.2.	Padronização das técnicas.....	16
3.2.1.	Testes de recuperação de parasitas em hortaliças.....	16
3.2.2.	Teste de recuperação de parasitas em água.....	16
3.3.	Área de estudo.....	17
3.4.	Questionário epidemiológico.....	18
3.5.	Coleta das amostras.....	18
3.6.	Amostras ambientais.....	18
3.7.	Amostras humanas.....	18
3.8.	Transporte das amostras.....	18
3.9.	Concentração das amostras ambientais e humanas.....	19
3.10.	Análise microbiológica para água de irrigação.....	19
3.11.	Análise microscópica para parasitas intestinais.....	20
3.12.	Análises moleculares.....	20
3.12.1.	Extração de DNA.....	20
3.12.2.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	20
3.12.3.	Eletroforese em gel de agarose.....	23
3.12.4.	Sequenciamento.....	23
3.13.	Geoprocessamento.....	23
3.14.	Atividades de educação em saúde.....	24
4.	Resultados.....	26
4.1.	Padronização das técnicas.....	26
4.1.1	Recuperação de parasitas em hortaliças.....	26
4.1.2	Recuperação de parasitas em água.....	26
4.2.	Propriedades participantes do estudo.....	26
4.5.	Coleta das amostras humanas e ambientais.....	32
4.6.	Análise microbiológica em água de irrigação.....	32
4.7.	Análise microscópica de parasitas.....	35

4.8.	Análise molecular	35
4.9.	Sequenciamento	40
4.11.	Atividades de educação em saúde.....	41
4.12.	Limitações da pesquisa	43
5.	Discussão	45
6.	Conclusão	57
7.	Referências	59
8.	APÊNDICES	72
	APÊNDICE 1- Termo de consentimento livre e esclarecido.....	72
	APÊNDICE 2 - Questionário do produtor participante	73
	APÊNDICE 3 - Protocolo de coleta amostras de água	74
	APÊNDICE 4- Transporte e armazenamento e registro.....	75
	APÊNDICE 5- Preparo do mix para realização da reação em cadeia da polimerase.....	76
	APÊNDICE 6- Material educativo sobre parasitas e doenças alimentares	77
	APÊNDICE 6 - Figuras obtida das propriedades participantes da pesquisa.....	79
9.	ANEXOS.....	81
	ANEXO 1 - Autorização Conselho Técnico Científico (CTC) do Instituto Adolfo Lutz	81
	ANEXO 2 - Autorização Comitê de Ética em Pesquisa- CEP.....	82
	ANEXO 3 – Protocolo Coleta Hortaliças	84
	ANEXO 4 - Protocolo de Coleta de Amostras da Mãos	85
	ANEXO 5 – Protocolo de Coleta de Amostras Fecais	87
	ANEXO 6 – Protocolo de Concentração das Amostras de Água	88
	ANEXO 7 – Protocolo de Pesquisa de Coliformes Totais e E. coli em Água de Irrigação	90
	ANEXO 8 - Protocolo de Extração de DNA	91
	ANEXO 9 – Protocolo de Purificação.....	93

*Revisão de
Literatura*

1. Revisão da literatura

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), zoonoses são doenças ou infecções comuns entre animais e humanos, cuja transmissão pode ocorrer de um para o outro de forma direta ou indireta quando há contato com animais, produtos derivados como: carne, leite, ovos ou com o ambiente no qual estavam presentes¹.

As zoonoses são causadas por diversos tipos de microrganismos e representam uma ameaça significativa à saúde pública, afetando também o crescimento econômico e a segurança da população em geral. Ao longo do tempo, mudanças no comportamento humano em relação a animais domésticos e selvagens, saneamento inadequado e a globalização proporcionaram a disseminação de diferentes agentes infecciosos². Dessa forma, frequentemente, a saúde humana, a saúde animal e a saúde ambiental são analisadas em conjunto, como um conceito de Saúde Única (*One Health*), a fim de resultar melhoria da eficácia e eficiência dos resultados associados à saúde^{3 4 5 6}.

Alguns dos agentes causadores das zoonoses podem ser veiculados por meio de água ou alimentos (ex: hortaliças, legumes) contaminados com material de origem fecal, na maioria das vezes, proveniente de esgoto doméstico indevidamente tratados ou sem tratamento, lançados *in natura* em cursos d'água⁷. Neste cenário, a contaminação de água e alimentos representa um grande risco para a propagação de parasitas devido a extensão em que atingem as populações; tanto para a nutrição quanto para atividades de abastecimento, irrigação e recreação^{8 9}.

Dentre as zoonoses, as doenças gastrointestinais de origem parasitária são consideradas problema de saúde pública mundial e acometem mais a população de países em desenvolvimento, principalmente grupos de baixa renda ligados a falta de saneamento básico adequado, contribuindo significativamente para a morbidade nesses locais. A toxoplasmose e a teníase estão presentes em um grupo formado por cinco doenças denominadas infecções parasitárias negligenciadas (IPN) e possuem menos atenção dos órgãos de saúde quando comparada a outras doenças^{10 11 12}. Atualmente, a diarreia causada por parasitas intestinais, é responsável por altas taxas de mortalidade em crianças menores de cinco anos nesses países¹³.

As Doenças de Transmissão Alimentar (DTA) ou Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) são doenças transmitidas por água e alimentos

contaminados por vírus, bactérias (e suas toxinas), protozoários, entre outros. São uma importante causa de morbidade e mortalidade no mundo com previsão de contínuo crescimento ao longo dos anos em decorrência do crescimento populacional e da exportação de alimentos e produtos animais. Nas Américas, doenças diarreicas são responsáveis por 95% das DTA com *T. solium* e *T. gondii* em destaque ^{14 15}.

Os protozoários patogênicos mais comumente abordados como responsáveis por doenças intestinais de transmissão hídrica são: *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. sendo *Cyclospora cayentanensis* e *Toxoplasma gondii* também detectados em água potável ⁹. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. ocorrem em todo o mundo, geralmente em águas superficiais, com maior capacidade de disseminação em meio hídrico ^{16 17}.

A elevada resistência a cloração usada nas estações de tratamento da água, torna a remoção destes organismos extremamente difícil, sendo os processos de tratamento por filtração um dos poucos meios de evitá-los ^{16 17}. Além disso, dados de Torgerson e colaboradores obtidos entre 2010-2015 mostram que cerca de 357 milhões de casos de doenças são ocasionados por: *Entamoeba* spp., *Cryptosporidium* spp. ou *Giardia* spp. e já ocasionaram cerca de 33.900 mortes ¹⁸.

De acordo com a OMS *C. parvum* e *C. hominis* são as espécies mais prevalentes em humanos e, em alguns casos, também infectam bovinos e ovinos ¹⁹. Porém, outras espécies também são capazes de infectar humanos e animais como a *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis* e *C. muris* ²⁰. Os oocistos podem permanecer infectantes no ambiente por um longo período de tempo devido a sua parede robusta que os protege contra danos físicos e químicos tornando-o de difícil eliminação em alimentos, água e ambiente. A transmissão do *Cryptosporidium* em sua maioria, é oral-fecal, sendo seus estágios de desenvolvimento divididos em várias fases ^{17 18 20 21}.

O protozoário *Giardia* spp. e, em especial, a espécie *G. duodenalis*, syn: *lamblia*, *intestinalis*, é encontrado em mamíferos, inclusive no homem, e é liberado no ambiente por meio das fezes contaminadas ¹⁹. *G. duodenalis* é o causador da doença diarreica “giardíase” seus cistos encontram-se em superfícies ou solo, alimentos ou água contaminados com fezes. É protegido por uma parede externa, sobrevive no ambiente por longos períodos, sendo também tolerante à desinfecção por cloro, tendo a água como modo de transmissão mais comum ²².

C. cayetanensis ocorre especialmente no homem. A eliminação de oocistos ocorre também pelas fezes ¹⁹. Algumas pessoas infectadas são assintomáticas, principalmente aquelas de áreas onde a ciclosporíase é endêmica, como regiões tropicais e subtropicais do mundo ²¹. Uma pessoa infectada lança oocistos de *Cyclospora* não esporulados nas fezes e estes requerem pelo menos 1-2 semanas no ambiente para esporular e tornarem-se infectantes. Portanto, a transmissão direta ou pela ingestão de água ou alimentos recém-contaminados é improvável e os oocistos possuem resistência a desinfecção convencionais ²³.

Teníase em humanos é a doença causada pelas espécies *T. saginata*, *T. solium* e *T. asiatica*. Os seres humanos podem se infectar comendo carne crua ou mal cozida. Os seres humanos são os únicos hospedeiros definitivos para *T. saginata* e *T. solium* e os ovos sobrevivem meses no ambiente, sendo encontrados em todo o mundo. A cisticercose humana pode ocorrer quando os ovos de *T. solium* são ingeridos ²⁴.

Toxoplasmose é uma doença de amplo espectro de infecção sobre o hospedeiro, causada por *T. gondii*, um patógeno que infecta grande parcela da população mundial ²⁵. Humanos podem adquirir a infecção após ingestão de oocistos esporulados em água ou alimentos contaminados; pela ingestão de cistos teciduais em carne crua/mal cozida, nas vísceras de animais infectados ou ainda verticalmente (gestante para o feto). *T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório com ciclo de vida em felídeos (hospedeiros definitivos) sendo eliminados no ambiente como oocistos pelas fezes ^{26 27 28}.

Os sintomas causados por estes parasitas são muito comuns entre si (com exceção no caso da toxoplasmose) ocorrendo geralmente: alterações gastrointestinais, diarreia, perda de peso, desidratação, náuseas, cólicas abdominais, vômitos, febre leve e fraquezas. A via de infecção é geralmente oral-fecal, sendo casos de surtos alimentares decorrentes de alimentos e água contaminados com material fecal¹⁹.

Em uma parcela de indivíduos, os sintomas podem ser mais graves, como no caso da toxoplasmose com sequelas oculares, confusão mental e aborto ou em fetos durante a gestação ²⁸ ou mesmo no caso da neurocisticercose com sequelas como convulsões, entre outros sintomas ²⁴.

No Brasil, leis dão suporte as questões de saneamento, qualidade das águas, padrões microbiológicos dos alimentos sendo: as diretrizes nacionais contidas na Lei nº 11.445 de 2007, o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano consta na Portaria de Consolidação nº 5 de 2017 do Ministério da Saúde que estabelece a pesquisa e monitoramento de coliformes totais e *Escherichia coli* como indicador microbiológico para água e parasitas como *Giardia* e *Cryptosporidium* somente nos casos onde *E. coli* excede o desejável nos pontos de captação de água. Para hortaliças frescas “*in natura*” a Resolução RDC Nº 12 de 2001, exige ausência apenas das bactérias *Salmonella* spp. nas análises laboratoriais ^{30 31}.

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) até 2017 97% da população brasileira possuía acesso a água potável no país e 86% possui acesso a rede sanitária. Porém, as estatísticas sobre esgoto no Brasil apontam uma realidade diferente, uma vez que 52% da população tem acesso a coleta de esgoto e 46% desse esgoto é tratado ³². A região Sudeste, considerada a mais desenvolvida do país, trata 50% de seu esgoto em geral. Dessa forma, fica claro que o setor ainda é muito deficiente ^{33 34} e muitos estados e municípios brasileiros estão em descumprimento de leis nacionais e carecem de saneamento básico adequado ³¹.

No Brasil diversos parasitas intestinais são investigados em verduras, água e também em seres humanos. No estado de São Paulo estudos vem sendo desenvolvidos há alguns anos observando a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em água superficiais e tratadas da capital ³⁴, Campinas ³⁵ e no centro-oeste paulista ³⁶ Com os novos estudos que buscam a presença de *T. gondii* e de *C. cayetanensis* em água, metodologias diferentes de detecção têm sido empregados para melhor identificar esses parasitas ³⁷.

As técnicas padronizadas para detecção de oocistos e cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em água são apresentados pela OMS ¹⁹ e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos ³⁸ Porém, o uso de filtração d'água em membranas como descrito por Muller ³⁴ e Cantusio Neto ³⁵, bem como o emprego de técnicas moleculares em pesquisa, tem aumentado a cada dia ³⁹.

O consumo de verduras em geral, vem sendo abordado como parte da dieta saudável por ter mais vitaminas, fibras e ser de baixa caloria quando comparado com produtos industrializados. Entretanto, as verduras *in natura* representam um importante veículo de parasitas, sendo um tema estudado há anos com relatos de

detecção de vários organismos em hortaliças comercializadas em supermercados, feiras livres e restaurantes ^{40 41}.

Trabalhos realizados no interior paulista, no município de São Carlos obtiveram *G. duodenalis* e *Strongyloides stercoralis* em alfaces ⁴²; no município de Ribeirão Preto foi possível identificar *Giardia* spp., *Ascaris* spp., entre outros ⁴³ e, em Presidente Prudente, relatou-se também *G. duodenalis* em agrião, alface crespa e salsinha⁴⁴.

Os estudos que buscam *T. gondii* são mais escassos, porém o uso de técnicas moleculares de PCR para identificação tem sido mais frequente sendo que a primeira detecção deste protozoário em diferentes amostras de verduras realizadas por Marchioro e colaboradores em 2016 ⁴⁵ no Paraná e Ferreira e colaboradores em 2018 também detectaram o parasita em hortaliças de diferentes municípios de Santa Catarina ⁴⁶.

Estes trabalhos mostram a importância das hortaliças nas infecções intestinais parasitárias. A infecção de produtores rurais por parasitas também é discutida em trabalhos a partir de análises fecais dos produtores com a finalidade de traçar uma possível relação entre infecção parasitária destes indivíduos e o risco de contaminação alimentar por manipulação sem higiene adequada; com ênfase na educação dos trabalhadores e monitoramento das condições sanitárias locais ^{47 48}.

Vários estudos de *G. duodenalis* em adultos e crianças no estado de São Paulo analisaram amostras fecais por microscopia em municípios como Marília e Lins ^{47 49} com a detecção de *G. duodenalis* em aldeias de pescadores ao longo do rio por biologia molecular ⁵⁰ em humanos e cães em Botucatu e em Pratânia com achado de *Cryptosporidium* spp. em humanos ⁵¹.

A gravidade das doenças parasitárias se dá pela relação entre carga parasitária e resposta imunológica do indivíduo. A infecção em indivíduos imunocomprometidos como pacientes com aids ou outras doenças infectocontagiosas, crianças e idosos desnutridos e pacientes sob tratamentos com imunossupressores (quimioterapia ou transplantados) pode ser persistente e grave, já que a imunidade nestes casos não é capaz eliminar o protozoário ¹⁹.

Além dos sintomas e riscos comumente abordados em estudos de parasitas intestinais, devemos ainda abordar sobre novos resultados que tem sido obtido nos últimos anos em relação ao agravo que estes parasitas podem ter em determinados grupos populacionais. As doenças inflamatórias intestinais como a colite ulcerativa,

doença de Crohn entre outras, tem tido sua origem melhor esclarecida nos últimos anos com um dos fatores do início dessas doenças ocorrer pelo desequilíbrio da microbiota intestinal no hospedeiro ⁵². Conforme apresentado anteriormente neste trabalho, a infecção de parasitas intestinais pode ter uma forte influência no ambiente intestinal dos indivíduos e na microbiota, principalmente aqueles que já sofrem de alguma doença inflamatória intestinal.

O trabalho de Einarsson, Ma'ayeh e Svard (2016) mostram que infecções por *Giardia* podem resultar em síndrome do intestino irritável (SII) e alergias alimentares ⁵³. Cheung e colaboradores (2018) descreveram a difícil situação da diferenciação de infecção de *Cryptosporidium* em um paciente que possui doença inflamatória intestinal, que pode levar a um agravamento da doença por uma terapia desnecessária quando não se constata o diagnóstico parasitário ⁵⁴.

Nestes casos de pacientes que já sofrem com algum tipo de morbidade, a infecção parasitária pode ser persistente e grave, já que a eliminação do parasita depende da condição imunológica na qual estes indivíduos se encontram ¹⁹

Assim, com base nestes estudos prévios, demonstra-se a importância de outras investigações desses parasitas importantes em saúde pública em amostras humanas e ambientais, no estado de São Paulo, com uso de análises sensíveis, como as técnicas moleculares; bem como, verificar a distribuição destes parasitas no ambiente, bem como sua ocorrência em humanos desta região, observando os fatores de risco para as infecções intestinais parasitárias.

Objetivos

2. Objetivos

Avaliar a ocorrência de parasitas importantes em saúde pública em hortaliças e água de irrigação em Bauru e amostras humanas. Caracterizar geneticamente os isolados encontrados e utilizar de técnica de geoprocessamento para determinar a distribuição espacial desses parasitas no meio ambiente.

Objetivos específicos:

- Observar a qualidade das hortaliças comercializadas segundo normas legais para consumo humano;
- Detectar diferentes espécies de parasitas por meio de técnicas microbiológicas e de biologia molecular;
- Constatar quais espécies de parasitas são mais encontradas nestas amostras;
- Sequenciar amostras positivas e realizar a análise filogenética;
- Identificar áreas de risco de infecções por meio de sistema de informação geográfica.

Material e

Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Autorizações.

O projeto foi aprovado pelo Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz (CTC- 03-k/2018) (Anexo 1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP (Anexo 2). Para obtenção das amostras humanas foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1) aos participantes voluntários sendo todos adultos maiores de 18 anos. Foi apresentado também os objetivos do projeto, exames a serem realizados, sendo esclarecido quaisquer questionamentos.

3.2. Padronização das técnicas.

Antes do início da coleta das amostras, foram criados protocolos para extração do material genético e para análise molecular para cada parasita e tipo de amostra. Estes protocolos passaram por testes de padronização para a validação das técnicas. Para a criação destes protocolos foram utilizados artigos científicos, manuais de órgãos de referência em saúde e meio ambiente, entre outros.

3.2.1. Testes de recuperação de parasitas em hortaliças.

Foi realizado teste de recuperação, de acordo com Franco ⁵⁵, em alface crespa utilizando-se uma amostra positiva para ovos de *Trichuris trichiura*, uma vez que os helmintos nesta forma são de fácil visualização e identificação morfológica. Uma pequena quantidade de amostra positiva foi depositada sobre as folhas de alface que posteriormente passaram pela técnica de lavagem e sedimentação espontânea em cálice. O sedimento foi coletado e visualizado em microscópio para procura dos ovos do parasita.

3.2.2. Teste de recuperação de parasitas em água.

O uso da técnica de filtração para pesquisa de diferentes microrganismos em água é presente em diversos estudos e é considerado essencial para retenção de microrganismos. Para esta pesquisa foi utilizado filtro de água da Millipore® de 1 litro e membrana SS de éster de celulose de 47 mm de diâmetro por 3 µm de porosidade. Para o teste de recuperação foram contaminados 3 litros de água destilada com 100µl

de amostra contendo ovos do parasita *Trichuris trichiura*. A amostra foi filtrada e passou por etapas de concentração e leitura de lâmina em microscópio óptico. ⁵⁶.

3.3. Área de estudo

Foi realizado um estudo transversal no município de Bauru, localizado no interior do estado de São Paulo, Brasil. Atualmente este é o município mais populoso do Centro-Oeste paulista com população estimada de mais de 364.000 habitantes (Figura 1). Sua área é de 673.488 km² de território, com clima tropical de altitude e temperaturas médias de 22,6°C. A vegetação é de cerrado e mata atlântica e o solo arenoso ⁵⁷.

Bauru tem duas bacias hidrográficas: bacia do Tietê-Batalha e Bacia do Tietê-Jacaré. Na primeira está o Rio Batalha, cuja nascente se encontra no município limítrofe de Agudos e é um importante afluente do Rio Tietê, com 167 km de extensão, sendo utilizado para abastecer 40% da população. Bauru também capta água do manancial subterrâneo, aquífero Guarani e atende os outros 60% da população da cidade ^{57 58}.



Figura 1: Localização do município de Bauru, no estado de São Paulo, Brasil.

Fonte: <http://www2.bauru.sp.gov.br/bauru.aspx?m=2>

3.4. Questionário epidemiológico

Um questionário epidemiológico foi aplicado inicialmente aos produtores com o objetivo de reconhecer o local de estudo e fazer o levantamento de dados importantes para a pesquisa (Apêndice 2).

3.5. Coleta das amostras

Todas as amostras utilizadas no presente trabalho foram coletadas no mesmo dia entre os meses de agosto e setembro de 2019. As coletas foram realizadas com uso de equipamento de proteção individual (EPI).

3.6. Amostras ambientais

Para as amostras de água de irrigação as coletas foram feitas em pontos onde a saída de água antecedia a irrigação, sendo na maioria dos reservatórios de armazenamento. Primeiramente foram coletados 200 mL de água em frascos específicos para análise microbiológica e posteriormente, foram coletados 2 litros de água em galões plásticos previamente esterilizados e, preparados com solução *Tween* 1%⁵⁶. (Apêndice 3).

Amostras de alface (*Lactuca sativa*) foram coletadas aleatoriamente na produção, sendo selecionados os pés maiores e com folhas mais abertas. Estas foram acondicionadas em sacos plásticos limpos, fechados com fita adesiva⁵⁵ (Anexo 3).

3.7. Amostras humanas

As amostras das mãos foram coletadas em sacos plásticos limpos sendo utilizado 200 mL de água destilada para a lavagem (Anexo 4).

Amostras fecais foram coletadas em coletor universal estéril, e sem conservantes pelos próprios participantes⁵⁹, sendo instruído que as mesmas deveriam ser mantidas sobre refrigeração até o momento de entrega do material. (Anexo 5)

3.8. Transporte das amostras

Após coleta, todos os frascos e galões das amostras ambientais bem como as embalagens plásticas contendo as amostras humanas de mãos e fezes foram identificadas com etiquetas contendo a data de coleta e nome dos responsáveis pelas

propriedades. As amostras foram transportadas sob refrigeração em caixas térmicas com gelo (com temperatura inferior a 10°C) até o laboratório de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratório Regional (CLR II) de Bauru e mantidas refrigeradas até o início das análises em até 24 horas. (Apêndice 4).

3.9. Concentração das amostras ambientais e humanas

As amostras foram submetidas a diferentes técnicas de concentração de acordo com protocolos de referência.

As amostras de lavagem das mãos dos manipuladores, das hortaliças e de fezes foram submetidas a técnica de sedimentação espontânea em cálice por cerca de 24 horas conforme método de HPJ^{59 60} e o sedimento final armazenado congelado a -20°C até início das análises (Anexos 3,4 e 5).

As amostras de água coletadas em galão foram submetidas ao processo de filtração em membrana SS em éster de celulose 3,0µm de poro e 47mm de diâmetro. Processos de raspagem e lavagem do conteúdo filtrado foi realizado durante 10 minutos com água destilada para a extração mecânica de parasitas. A solução resultante foi centrifugada em tubo cônico por 15 minutos a 2.800 rpm e o sobrenadante retirado, deixando apenas o sedimento. Em seguida, uma segunda centrifugação foi realizada com água destilada. O sedimento final das centrifugações foi armazenado congelado a -20°C até início das análises^{55 56} (Anexo 6).

3.10. Análise microbiológica para água de irrigação

Para avaliar as condições microbiológicas da água utilizada para a irrigação dos cultivos de hortaliças das propriedades, tais amostras foram submetidas ao teste por indicador colorimétrico, *Colilert*® (INDEXX) conforme recomendações do fabricante⁶¹. Este kit utiliza tecnologia com substrato no qual bactérias do grupo coliformes totais e do grupo *E. coli* metabolizam os indicadores nutrientes ONPG (ortonitrofenol-beta-galacto-piranosideo) e MUG (4-methyl-umbelipherilb-D-glucuronide) respectivamente, o que aponta presença ou ausência dessas bactérias pela coloração da água que são avaliados com o auxílio da cabine de análise de fluorescência, que utiliza luz UV (Anexo 7).

3.11. Análise microscópica para parasitas intestinais

Para avaliar as amostras fecais, foi realizada também leitura das fezes em microscópio óptico. Uma alíquota do sedimento fecal das amostras (processado anteriormente) foi corada com iodo de Lugol e visualizada em microscópio para busca dos parasitas *Giardia duodenalis* e *Taenia*. Não foi possível utilizar a técnica de Ziehl-Neelsen específica para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Cyclospora* spp.

3.12. Análises moleculares

3.12.1. Extração de DNA

Amostras de controle positivo foram obtidas de instituições parceiras para realização de teste piloto para avaliar a extração de DNA com uso do kit de extração QIAamp® *Fast DNA Stool Mini Kit*⁶² de acordo com as informações do fabricante com algumas modificações como etapas de congelamento em nitrogênio líquido e aquecimento a 95°C para rompimento de paredes mais espessas de alguns protozoários. Foram realizados testes também com o *Illustra Tissue and Cells Genomic Prep Mini Spin Kit*® (GE Healthcare) para comparação da qualidade das extrações. Após padronização, o QIAamp® *Fast DNA Stool Mini Kit* (Qiagen) demonstrou melhor desempenho, com reagentes capazes de remover inibidores de PCR das amostras e foi selecionado para uso tanto nas amostras de fezes, quanto nas demais amostras de água, lavagem das mãos e das hortaliças⁶³ (Anexo 8).

3.12.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para amplificação dos fragmentos de DNA dos protozoários investigados, foi realizado levantamento bibliográfico em artigos científicos, de *primers* comumente usados na identificação molecular de cada um dos microrganismos. A sequência *forward* e *reverse* de cada *primer* foi adicionada no *Basic Local Alignment Search Tool* (Blast) para análise da similaridade com as regiões do DNA dos parasitas. As sequências que demonstraram melhor especificidade, foram utilizadas.

Para *Cryptosporidium* spp. a região de amplificação foi do gene 18S rRNA. Os iniciadores utilizados na primeira reação foram BCOWP *Forward* e BCOWP *Reverse* que amplificam 769 pb e na segunda reação CPB-DIAG *Forward* e CPB-DIAG *Reverse* que amplificam fragmentos de 435-503 pb⁶⁰.

Para *Giardia duodenalis* a região de amplificação foi do gene 16S rRNA, utilizando os iniciadores Gia2029 e Gia2150c que amplificam fragmentos de 497pb e na segunda reação, os iniciadores RH11 e RH4, que amplificam fragmentos de 292-297pb ⁶⁵.

Para *Toxoplasma gondii*, foram utilizados os *primers* TOX4 e TOX5 que amplificam um fragmento de 529 pb cuja sequência se repete de 200 a 300 vezes no genoma do *T. gondii* ⁶⁶.

Para *Cyclospora cayetanensis* foram utilizados os *primers* CCITS2-F e CCITS2-R que amplificam uma região de 116 pb dentro da região ITS-2 do genoma do parasito ⁶⁷.

Para detecção molecular de *Taenia* spp. foram utilizados os *primers* Cest 3 e Cest 5 que amplificam 267 pb da região alvo do gene *rrnS* do genoma ⁶⁸.

As reações de PCR foram realizadas com *Go Taq® Green Master Mix®* (Promega) ⁶⁹. Tal reagente apresentou bons resultados quando testado durante padronização com amostras controle positivas. O mix utilizado constituiu-se de 12,5µl de *GoTaq® Green Master Mix®*, 1 µl de *primer forward* a 10µM, 1 µl de *primer reverse* a 10µM, 7,5 µl de água ultra-pura e volume de DNA extraído entre 3-5 µl (Apêndice 5).

As amostras foram incubadas em termociclador de gradiente (Life Technologies®) sendo as informações sobre ciclagem e *primers* utilizados apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Primers utilizados e seus respectivos perfis de ciclagem

Parasita/gene	Amplicon	Sequência dos primers (5'- 3')	Ciclagem	Referencia
<i>Cryptosporidium</i> spp. (COWP; SSU rRNA)	769 pb	PCR BCOWP F: ACCGTTCTCAACAACCATCTTGTCCTC BCOWP R: TAAGGTGCTGAAGAAGTAAGG	5 min → 94°C 30 seg → 94°C 30 seg → 64°C 30 seg → 72°C	35 ciclos LEETZ, SOTIRIADOU e ONGERTH, 2007
	435-503 pb	Nested CPB-DIAG F: AAGCTCGTAGTTGGATTTCTG CPB- DIAG R: TAAGGTGCTGAAGAAGTAAGG	5 min → 72°C	
<i>Giardia duodenalis</i> (16s rRNA)	497 pb	PCR Gia 2029: AAGTGTGGTGCAGACGGACTC Gia 2150c: CTGCTGCCGTCCTTGATGT	4 min → 96°C 1 min → 96°C 45 seg → 58°C 1 min → 72°C 4 min → 72°C	35 ciclos APPELBEE et al.,2003 (adaptado)
	292-297pb	Nested RH 11: CATCCGGTGCATCCTGCC RH4: AGTCGAAGGCTGATTCTCCGCCAGG	4 min → 96°C 45 seg → 96°C 30 seg → 59°C 45 seg → 72°C 4 min → 79°C	
<i>Toxoplasma gondii</i> (Fragmento repetido do genoma)	529 pb	PCR TOX 4: CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG TOX 5: CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT	7 min → 94°C 1 min → 94°C 1 min → 55°C 1 min → 72°C 10 min → 72 °C	35 ciclos HOMAN et al., 2000.
<i>Taenia</i> spp. (rrns)	267 pb	PCR Cest 3: YGAYTCTTTTTAGGGGAAGGTGTG Cest 5: GCGGTGTGTACMTGAGCTAAAC	15 min → 95°C 30 seg → 94°C 90 seg → 58°C 10 seg → 72°C 7 min → 72°C	40 ciclos KOHANSAL et al., 2017.
<i>Cyclospora cayetanensis</i> (ITS-2)	116 pb	PCR CCITS2-F: GCAGTCACAGGAGGCATATATCC CCITS2-R: ATGAGAGACCTCACAGCCAAAC	2 min → 95° 30 seg → 95° 30 seg → 59° 30 seg → 72° 5 min → 72°	40 ciclos LALONDE e GAJDHAR, 2008.

Legenda: pb – pares de base, t°- temperatura, seg- segundo, min- minuto.

3.12.3. Eletroforese em gel de agarose

A visualização do material amplificado foi avaliada em gel de agarose 1,5%, adicionado 0,1 µL/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). Foram utilizados 8 µL de cada produto amplificado e como marcador de peso molecular, 5 µL de 100pb ladder (Invitrogen®). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 1X (89 nM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) e voltagem de 60V por 60 minutos. Após o término da corrida, o gel foi analisado em transiluminador (Syngene®, EUA) sob luz ultravioleta (296 nm) e a imagem foi capturada com auxílio de câmera digital Cannon® e visualizada em computador com software EOS utility®.

3.12.4. Sequenciamento

As amostras que apresentaram bandas únicas no gel de agarose foram purificadas utilizando-se 4 µL da enzima Exosap (USB) e 10 µL de produto da PCR, que foram incubados durante 1 hora a 37°C e posteriormente por 20 minutos a 80°C. Já as amostras com mais de uma amplificação no gel de agarose, foram purificadas por meio do MinElute PCR Purification Kit® (QIAGEN). Os *amplicons* purificados foram sequenciados pelo método Sanger, como serviço de terceiros no Instituto de Biotecnologia (IBTEC) e laboratório de Biotecnologia Pesquisa e Inovação (BPI) em Botucatu-SP. Após obtenção dos resultados, as sequências *forward* e *reverse* foram visualizadas em software Chromas 2.6.6, em formato de eletroferograma, com alinhamento pelo programa MEGA X ⁷⁰, submetidas ao *Blast* para comparação com as sequências depositadas no banco de dados. (Anexo 9).

3.13. Geoprocessamento

Para todos os locais de coletas, foram obtidas as coordenadas geográficas por GPS (Global Positioning System) e as mesmas foram localizadas por meio do Google Earth®. A aplicação de geocodificação de endereços permitirá as análises dos dados de interesse para a distribuição dos casos positivos, permitindo a identificação e delimitação das áreas de risco.

3.14. Atividades de educação em saúde

Além da coleta das amostras para o desenvolvimento da pesquisa, foram realizadas atividades educacionais com os produtores e suas equipes, com foco em auxiliar na melhoria da qualidade das hortaliças produzidas e comercializadas em Bauru-SP.

Primeiramente foi realizado contato com a Secretaria Municipal de Agricultura e Abastecimento (SAGRA) que auxiliou na intermediação com os participantes. Dos produtores contatados, cinco aceitaram participar da pesquisa e se enquadravam no escopo da mesma, no qual deveriam cultivar alface (*Lactuca sativa*) em solo, utilizar água da própria propriedade para irrigação por aspersão e ter pelo menos um trabalhador que mantivesse contato direto com a plantação, sendo este voluntário para ceder amostras fecais e das mãos para coleta.

Uma reunião foi realizada com cada um para apresentação do projeto. Após esta fase iniciaram-se as visitas em campo e semanalmente os resultados obtidos foram sendo atualizados aos responsáveis das propriedades para uma coletiva identificação de origens de contaminações sugestões de melhorias no local como colocação de telas nos cultivos e reservatórios para evitar contato dos animais locais, a higienização das mãos dos trabalhadores entre outros. Um relatório foi desenvolvido com os resultados finais, bem como, um material educativo para os produtores e suas equipes. (Apêndice 6)

Resultados

4. Resultados

4.1. Padronização das técnicas

4.1.1 Recuperação de parasitas em hortaliças.

O parasita *T. trichiura* foi encontrado no material das lâminas, após análise microscópica. Dessa forma, foi possível validar as técnicas de lavagem e concentração como eficazes e anexá-las aos nossos protocolos.

4.1.2 Recuperação de parasitas em água.

No resultado do teste, detectou-se a presença de *T. trichiura* em água após leitura do produto filtração em membrana em microscópio óptico. Dessa forma, a técnica artificial de contaminação foi promissora e por esse motivo essas etapas foram validadas e anexadas para uso em nosso protocolo.

4.2. Propriedades participantes do estudo

As figuras 2 a 6 apresentam a vista superior das propriedades participantes do estudo, obtidas por satélite do Google Earth®. Das cinco propriedades participantes, quatro (A, B, C e E), se encontram nas áreas rurais do município próximas ao limite com outros municípios e uma propriedade (D) se encontra em região urbanizada da cidade.



Figura 2: Vista superior da propriedade rural A no município de Bauru, São Paulo, obtida por satélite do Google Earth®.



Figura 3: Vista superior da propriedade rural B no município de Bauru, São Paulo, obtida por satélite do Google Earth®.



Figura 4: Vista superior da propriedade rural C no município de Bauru, São Paulo, obtida por satélite do Google Earth®.



Figura 5: Vista superior da propriedade rural D no município de Bauru, São Paulo, obtida por satélite do Google Earth®.



Figura 6: Vista superior da propriedade rural E no município de Bauru, São Paulo, obtida por satélite do Google Earth®.

4.3. Questionário Epidemiológico

Os resultados obtidos a partir do questionário aplicado aos produtores (Apêndice 2) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Relação dos dados de feira, cultura/cultivo, irrigação, uso de adubo e agrotóxico, merenda, comercialização para outros municípios, animais presentes na propriedade e processos pré-comercialização, obtidos das cinco propriedades participantes do estudo no município de Bauru-SP, a partir da aplicação de questionário.

PROPRIEDADE	FEIRAS	CULTURA	CULTIVO	IRRIGAÇÃO	ADUBO	AGROTOXICO	COMÉRCIO	OUTROS MUNICÍPIOS	ESPÉCIES ANIMAIS	PROCESSOS
A	Não	Solo	4 a 6 tipos	Riacho	Orgânico/ Comercial (esterco galinha)	Sim	Merenda	Pederneiras Lençóis Paulista	Suínos, aves e caninos	Pré- lavado e embalado
B	Não	Solo	2 a 3 tipos	Riacho	Orgânico (esterco vaca)	Sim	Merenda	Pederneiras Igaraçu do Tietê	Bovinos, aves, caninos e felinos	Pré- lavado, cortado, embalado e pesado
C	Não	Solo e estufa	> 7 tipos	Poço artesiano	Orgânico (esterco gado/ galinha)	Não	Mercado e Supermercado	Ribeirão Preto/ Agudos/Marília	Equinos e suínos	Pré- lavado e embalado
D	Local fixo	Solo	> 7 tipos	Poço artesiano	Orgânico	Sim	Venda direta	-	Não	Pré- lavado e embalado
E	Não	Solo	4 a 6 tipos	Poço artesiano	Orgânico	Sim	Merenda	Igaraçu do Tietê	Aves e felinos	Pré- lavado

Legenda: (-) não comercializa para outros municípios.

A partir deste questionário e das visitas aos locais, foi possível obter acesso a diversas características importantes para cada local (Apêndice 2).

4.4. Descrição das propriedades

A Propriedade A, localiza-se na região rural da cidade e possui cerca de 15.345 m² área de cultivo, com presença de caninos, aves e suínos (até pouco tempo antes do início da pesquisa) e área de cultivo com livre acesso aos animais. Utiliza água de riacho que passa próximo a propriedade para irrigação, estocando a mesma em reservatório a céu aberto também sem proteção de telas ou cercas. Os animais da propriedade possuem livre acesso a este reservatório. De acordo com o produtor, as hortaliças são adubadas com produto de origem animal comercial provenientes de esterco de galinhas. O cultivo é direcionado à merenda escolar de outros municípios da região, Pederneiras e Lençóis Paulista.

A Propriedade B localiza-se também em área rural da cidade, com cerca de 2.258 m² de área de cultivo e uso de água para irrigação do mesmo riacho do produtor A, porém, esclarece que capta água mais próximo da nascente. Na propriedade há presença de: felinos, caninos, aves e bovinos. O cultivo é cercado por inteiro por telas laterais, dificultando o acesso destes animais para a plantação. A forma de adubo utilizada é o esterco dos bovinos criados no local, sendo as fezes submetidas a um pré-tratamento de secagem ao sol, pelo produtor. A comercialização desses produtos também é encaminhada para merenda escolar dos municípios de Pederneiras e Igarapu do Tietê.

A Propriedade C possui cerca de 64.561 m² de área de cultivo plantação de diversos tipos de hortaliças. Há criação de equinos, suínos, bem como, os domésticos caninos e felinos que frequentemente encontravam-se soltos próximo ao cultivo durante as visitas ao local, logo a área de cultivo não é cercada. A água proveniente de poço artesiano também fica estocada em reservatórios para uso na irrigação. Estes reservatórios localizam-se próximo ao cultivo, sem cerca ou telas de proteção. O produtor esclarece que utiliza esterco de aves e bovinos como adubo. A comercialização das verduras é feita para supermercados de grande porte da cidade e para outros municípios da região como Ribeirão Preto, Agudos e Marília.

A Propriedade D localizada em uma área de muitos condomínios e com alta circulação de veículos com cerca de 2.552 m². No local há o plantio de muitos tipos de hortaliças e não há criação ou presença de qualquer tipo de animal. O cultivo era parcialmente cercado com telas. A comercialização é realizada diretamente ao consumidor no local. A água utilizada para irrigação é proveniente de poço artesiano e é estocada em reservatório coberto com tela. Neste reservatório por uma vez, foi encontrado um lagarto de pequeno porte morto no local, cuja espécie não pode ser identificada. O poço utilizado não se encontra dentro da propriedade. A produtora e demais funcionários da produção consomem as hortaliças ali produzidas e ingerem a água do poço diariamente. Durante visitas ao local foi visto a manipulação de esterco animal de origem bovina bem próximo ao reservatório de água e o mesmo era mantido ali para uso diário na adubação por alguns dias.

A Propriedade E não pode ter sua área de cultivo quantificada, era toda cercada nas laterais. A água utilizada é de poço artesiano pertencente a propriedade. Há presença de animais no local sendo estes: felinos e aves. Destina maior parte das suas hortaliças para merenda escolar do município de Igarapu do Tietê.

4.5. Coleta das amostras humanas e ambientais

Foram obtidas ao todo 136 amostras ambientais e humanas das propriedades de Bauru-SP. Destas, obtivemos 95 amostras ambientais compostas por: 33 amostras de água de irrigação e 62 amostras de hortaliças do tipo alface. Das amostras humanas obtivemos 41 amostras sendo: 31 da lavagem das mãos dos manipuladores e dez de fezes dos mesmos

4.6. Análise microbiológica em água de irrigação

Os resultados obtidos no teste microbiológico *Colilert*®⁶¹ para a água de irrigação das propriedades é vista na Figura 7.

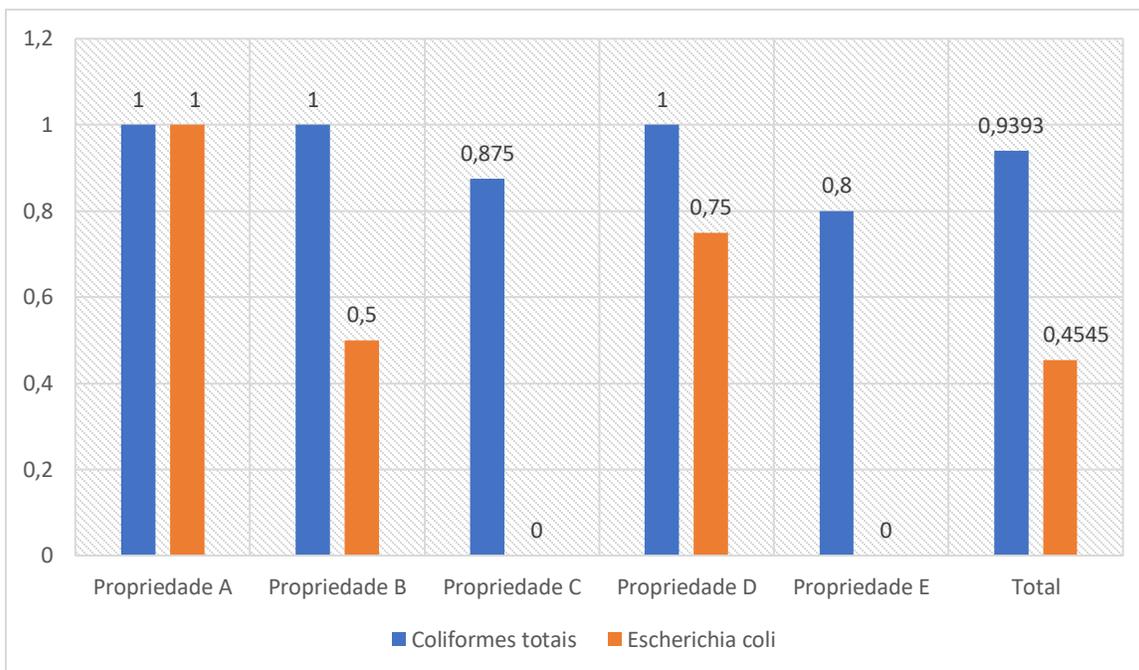


Figura 7. Avaliação das amostras de água de irrigação das propriedades do município de Bauru- SP, no teste microbiológico com uso de kit colorimétrico – *Colilert*®

A leitura da amostra com cor amarela (Figura 8) aponta os resultados positivos para Coliformes totais e a presença de fluorescência em tons de azul nas amostras indica presença de *E. coli* (Figura 9).

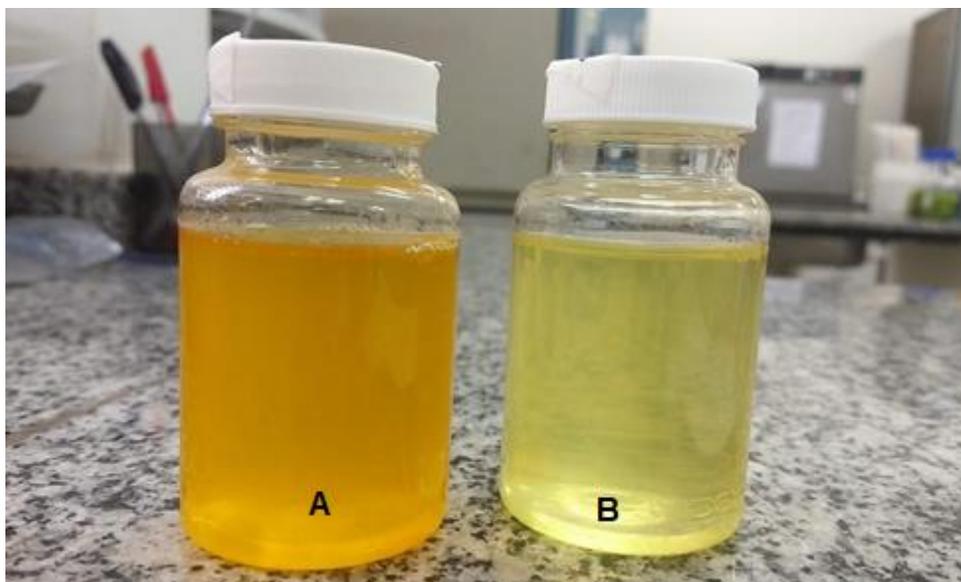


Figura 8: Leitura de amostras de água de irrigação procedente de reservatório localizado na propriedade A e de poço localizado na propriedade E, em Bauru-SP. Uso do indicador colorimétrico Colilert® após 24 horas de incubação em estufa a +/- 35°C. Resultado amarelo (A)- positivo para Coliformes Totais. Resultado incolor (B)- negativo. Fonte: arquivo pessoal

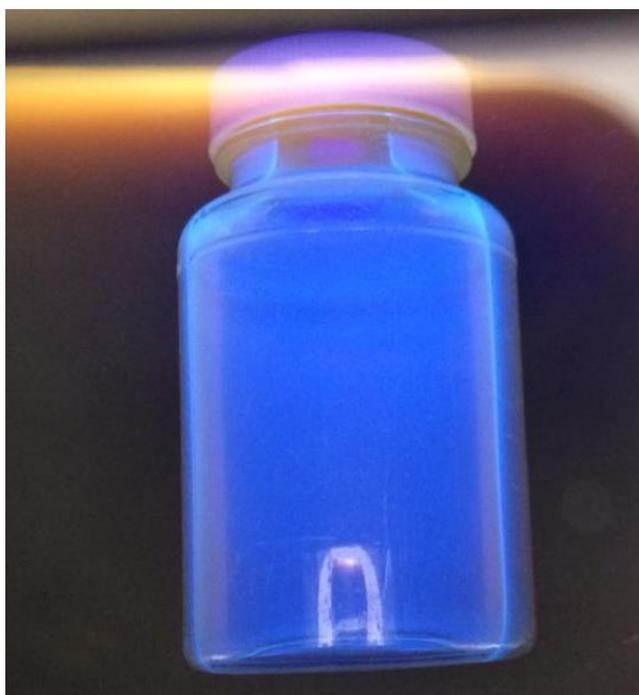


Figura 9: Leitura de amostra de água de irrigação procedente de reservatório localizado na propriedade rural D em Bauru, sob luz UV com uso de indicador colorimétrico Colilert®. Resultado o azul/fluorescente – positivo para *E. coli*. Fonte: Arquivo pessoal.

4.7. Análise microscópica de parasitas

Na leitura das amostras fecais na microscopia, não foram identificadas nenhuma das formas parasitárias como cistos, oocistos e ovos de helmintos.

4.8. Análise molecular

Das 136 amostras ambientais e humanas, submetidas à técnica molecular de PCR para pesquisa dos parasitas alvo, 54 amostras amplificaram de forma específica na região de interesse.

Foram encontradas 16 amostras positivas para *Giardia* spp., uma amostra positiva para *Taenia* spp., cinco amostras positivas para *Cryptosporidium* spp., 32 amostras positivas para *Cyclospora cayetanensis*, sendo que nenhuma amostra foi positiva para *T. gondii*. (Tabela 3).

Nas amostras ambientais *C. cayetanensis* foi o tipo mais prevalente ocorrendo em água de irrigação em 62,5% (20/32) do total e em 34,4% (11/62) das amostras de hortaliças.

Nas amostras ambientais *Giardia* spp. apresentou maior prevalência em 18,8% (3/31) amostras das mãos e em 12% (2/10) das amostras fecais. A prevalência de cada parasita nas amostras é visto na Tabela 3.

Tabela 3: Resultado de PCR para os parasitas em cada tipo de amostra das propriedades participantes do estudo no município de Bauru- SP, entre agosto e setembro de 2019.

PARASITA	ÁGUA		HORTALIÇAS		MÃO		FEZES		TOTAL
	Total (n=33)	%	Total (n=62)	%	Total (n=31)	%	Total (n=10)	%	
<i>Giardia</i> spp.	2	12,5%	9	56,3%	3	18,7%	2	12,5%	16
<i>Taenia</i> spp.	0	0%	1	100,0%	0	0%	0	0%	1
<i>Cryptosporidium</i> spp.	3	60,0%	0	0,0%	1	20,0%	1	20,0%	5
<i>C. cayetanensis</i>	22	62,5%	10	34,4%	1	3,1%	0	0%	33
<i>T. gondii</i>	0	-	0	-	0	-	0	-	0
Total	27	49%*	20	36%	5	9%	3	5%	55

(*) porcentagem baseada no total de amostras positivas

Também podemos afirmar que o tipo de parasita mais presente em um único tipo de amostra foi *C. cayetanensis* como visto na Figura 10.

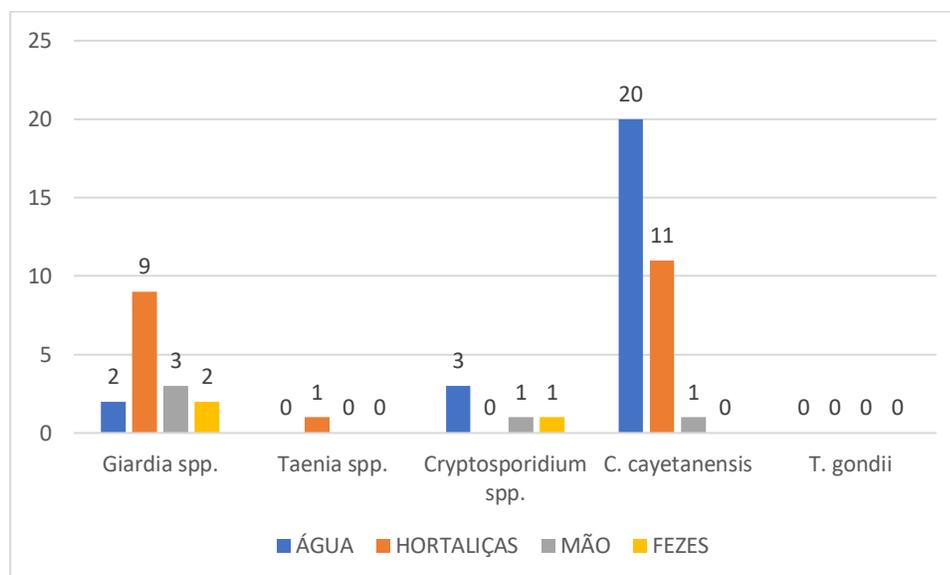


Figura 10: Presença de parasitas detectados na PCR em cada tipo de amostra ambiental e humana coletada das propriedades do município de Bauru-SP entre agosto e setembro de 2019.

Na Tabela 4 é possível observar a quantidade de amostras coletadas e a quantidade de amostras positivas para cada tipo de amostra nas cinco propriedades.

Pode-se afirmar que a propriedade C apresentou 100% de suas amostras de água de irrigação positivas na análise molecular.

Já a propriedade D apresentou a porcentagem mais alta de hortaliças contaminadas (56%) dentre as demais propriedades (Tabela 4).

A propriedade A apresentou a mais alta taxa (43%) de positividade para amostra das mãos dos manipuladores dentre todas as propriedades.

Por fim, o trabalhador voluntário da propriedade C apresentou 100% de suas amostras fecais positivas para parasitas (Tabela 4).

Tabela 4- Resultados das amostras ambientais e humanas positivas para parasitas na PCR de acordo com as propriedades participantes do estudo no município de Bauru-SP, entre agosto e setembro de 2019.

Propriedade	Amostras de Água de Irrigação			Amostras de Hortaliças			Amostras das Mãos			Amostras das Fezes		
	Quant Amostras	Quant. Positivo	% de Positivo	Quant Amostras	Quant. Positivo	% de Positivo	Quant Amostras	Quant. Positivo	% de Positivo	Quant Amostras	Quant. Positivo	% de Positivo
A	6	4	67%	14	4	29%	7	3	43%	2	0	0%
B	6	6	100%	6	1	17%	6	1	17%	2	0	0%
C	8	8	100%	16	5	31%	7	0	0%	2	2	100%
D	8	7	88%	16	9	56%	6	0	0%	2	1	50%
E	5	2	40%	10	1	10%	5	1	20%	2	0	0%
Totais	33	27	82%	62	20	32%	31	5	16%	10	3	30%

De acordo com a Tabela 5, vemos que todas propriedades apresentaram amostras de água de irrigação e hortaliças positivas. Vemos também que as amostras provenientes dos trabalhadores das propriedades C e D apresentaram positividade para parasitas nas fezes.

Na Tabela 5, observa-se também que as amostras de água de irrigação foram as que apresentaram maior positividade de parasitas dentre as demais amostras.

Verificou-se que quanto aos manipuladores, nos casos de positividade nas mãos não apresentou positividade nas fezes e aqueles que foram positivos nas fezes não tiveram positividade nas mãos. Dessa forma, pode-se afirmar que não houve relação direta entre a positividade nas mãos e fezes.

Tabela 5: Dados das amostras positivas para parasitas na técnica de PCR nas cinco propriedades do município de Bauru- SP, entre agosto e setembro de 2019.

Propriedade	Água de irrigação	Hortaliças	Mãos	Fezes	Total
A	4 <i>Cyclospora</i>	3 <i>Giardia</i> 1 <i>Cyclospora</i>	1 <i>Cryptosporidium</i> 1 <i>Giardia</i> 1 <i>Cyclospora</i>	0	11
B	1 <i>Cryptosporidium</i> * 5 <i>Cyclospora</i>	1 <i>Giardia</i>	1 <i>Giardia</i>	0	8
C	1 <i>Cryptosporidium</i> 6 <i>Cyclospora</i> 1 <i>Giardia</i>	3 <i>Giardia</i> 1 <i>Taenia</i> 1 <i>Cyclospora</i>	0	2 <i>Giardia</i>	15
D	1 <i>Cryptosporidium</i> 5 <i>Cyclospora</i> 1 <i>Giardia</i>	2 <i>Giardia</i> 7 <i>Cyclospora</i>	0	1 <i>Cryptosporidium</i>	17
E	2 <i>Cyclospora</i>	1 <i>Cyclospora</i>	1 <i>Giardia</i>	0	4
Total/ n amostral	27/33	20/62	5/31	3/10	55/136

(*) amostra com dupla contaminação de *Cryptosporidium* spp. e *C. cayetanensis*

A Figura 11 apresenta gel de agarose com três amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. em águas de irrigação de riacho e de poço artesiano de propriedades do município de Bauru-SP.

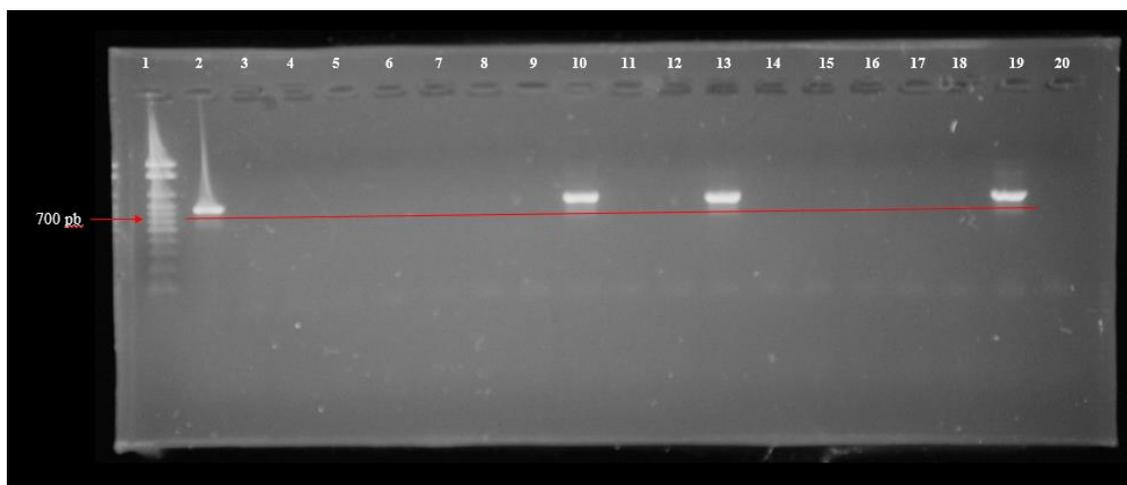


Figura 11: Linha 1- Marcador, Linha 2 amostra positiva de *Cryptosporidium* spp. água de poço artesiano, Linha 3 a 9 – amostras negativas, Linha 10 amostra positiva de *Cryptosporidium* spp. de água de riacho, Linha 11 e 12 – amostras negativas, Linha 13- amostra positiva de *Cryptosporidium* spp. de água de poço artesiano, Linha 14 a 18- amostras negativas, Linha 19 – Controle positivo de *Cryptosporidium* spp., Linha 20- Controle negativo.

A Figura 12 apresenta gel de agarose com uma amostra positivas para *Taenia* spp. em hortaliças de propriedade rural do município de Bauru-SP.

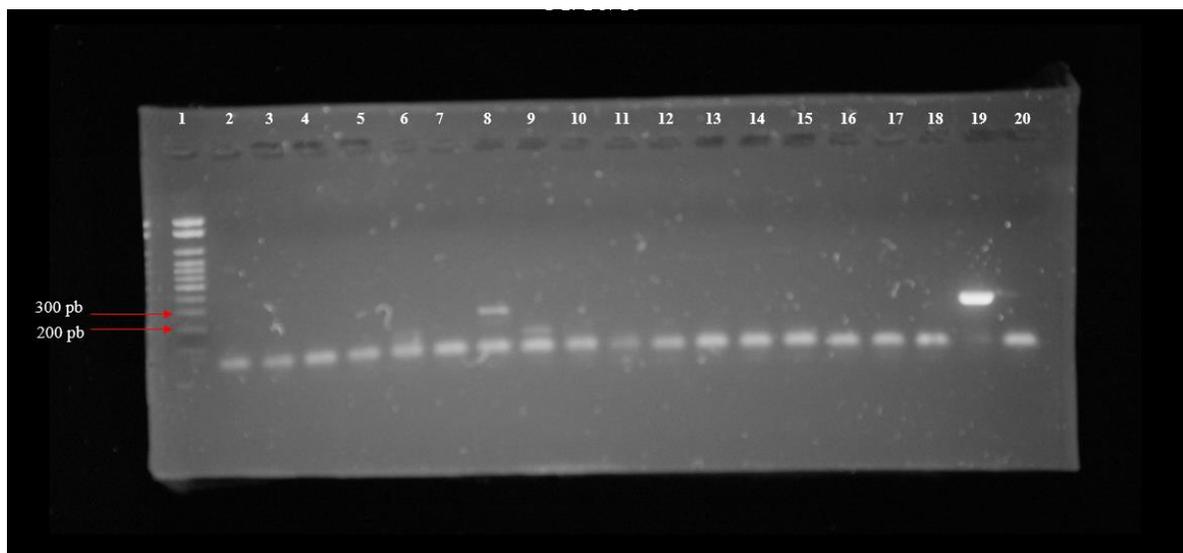


Figura 12: Linha 1- Marcador 100 pb, Linha 2 a 7- Amostra negativa, Linha 8- amostra positiva para *Taenia* spp. em hortaliça, Linha 9 a 18 – amostra negativa, Linha 19 – Controle Positivo para *Taenia* spp., Linha 20 - Controle negativo.

A Figura 13 apresenta gel de agarose com amostras positivas para *C. cayetanensis* em água de riacho e poço de propriedades do município de Bauru-SP.

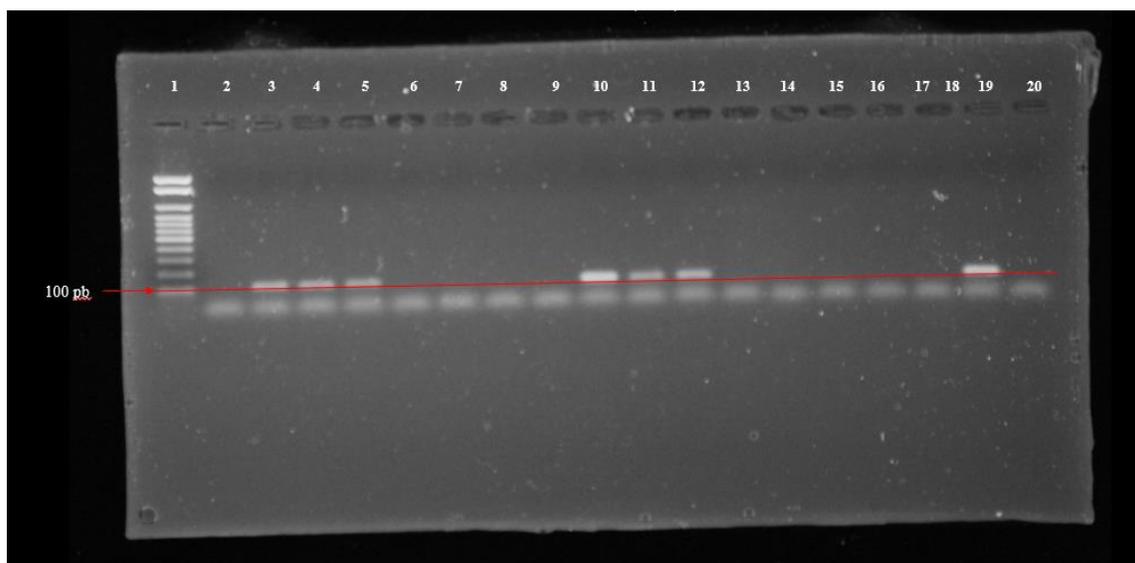


Figura 13: Linha 1- Marcador, Linha 2 amostra negativa, Linha 3 a 5 amostra positiva de *C. cayetanensis* água de poço artesiano, Linhas 6 a 9- negativa. Linha 10 a 12 – amostras positivas para *C. cayetanensis* em água de riacho, Linhas 13 a 18 – amostras negativas, Linha 19- Controle positivo de *C. cayetanensis*, Linha 20- Controle negativo.

A Figura 14 apresenta uma amostra de *Giardia* spp. positiva em água de irrigação de poço artesiano de propriedade rural do município de Bauru-SP.

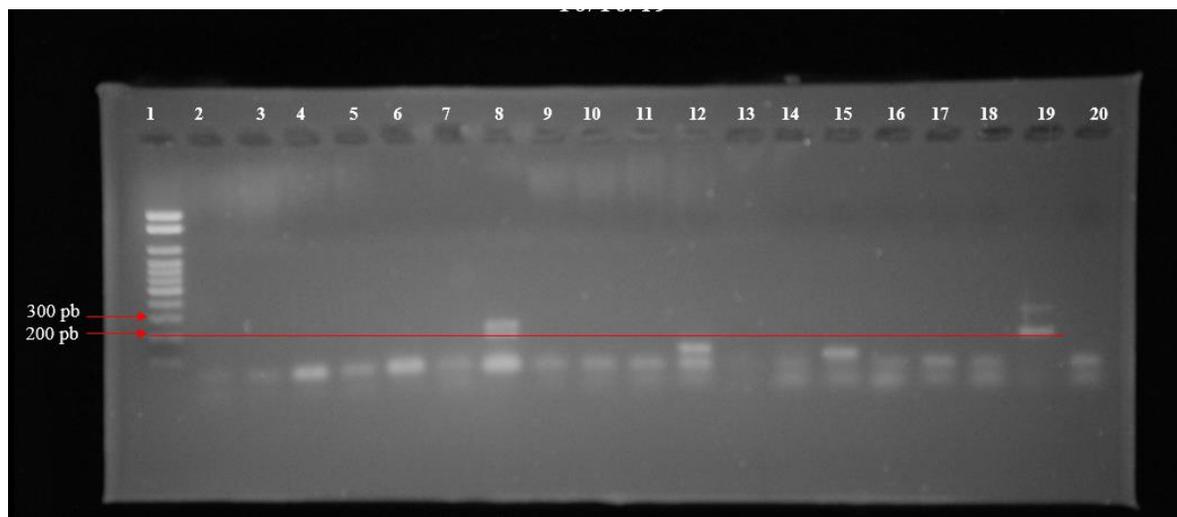


Figura 14: Linha 1- Marcador 100 pb, Linha 2 a 7- amostras negativas, Linha 8 – amostra positiva para *Giardia* spp. em água de poço artesiano, Linha 9 a 18 – amostras negativas, Linha 19- Controle positivo para *Giardia* spp., Linha 20- Controle negativo

4.9. Sequenciamento

Todas as amostras ambientais e humanas positivas com quantidades >20 ng/ μ l de DNA foram sequenciadas. Aquelas que apresentaram quantidade <20 ng/ μ l de DNA observado após quantificação, não puderam ser encaminhadas.

Obtivemos os resultados do sequenciamento de duas amostras positivas para *C. cayetanensis* na eletroforese. Os dados das sequências de nucleotídeos das amostras apresentaram similaridade entre 81,58% a 98,59%, sendo todas com a identidade da sequência nº de acesso AF301386.1.

Foram enviadas 55 amostras positivas para sequenciamento sendo: 27 foram de água, 20 de hortaliças, 5 das mãos dos manipuladores e 3 de fezes. Uma amostra de água de irrigação apresentou dupla contaminação por *Cryptosporidium* e *Cyclospora*.

4.10. Geoprocessamento

A distribuição espacial dos parasitas detectados foi realizada a partir de técnicas de geoprocessamento, pela própria equipe, nas áreas estudadas. Foram utilizadas as coordenadas geográficas das propriedades e os resultados obtidos na análise molecular

para a construção dos mapas com o fim de proporcionar uma melhor visualização desses dados em conjunto (Figura 15).

4.11. Atividades de educação em saúde

As atividades de educação em saúde foram realizadas com os produtores e suas equipes durante todas as visitas para coleta e também após obtenção dos resultados. Foram discutidos fatores de risco para os cultivos, sugestão de melhorias e adequações na propriedade entre outros temas pertinentes conforme os resultados das análises laboratoriais. Também foi entregue material educativo sobre as doenças parasitárias abordadas no presente trabalho, sendo este material de autoria de nossa própria equipe de pesquisa (Apêndice 6).



Figura 15: Vista superior do município de Bauru - SP obtida por satélite do Google Earth®, com a localização geográfica de cada propriedade participante do estudo e identificação dos parasitas detectados.

4.12. Limitações da pesquisa

Durante o desenvolvimento da pesquisa algumas limitações foram encontradas, tal situação gerou atraso em algumas etapas ou alterações na execução do projeto.

- A aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa, foi submetida no mês de Junho de 2018 e aprovada em dezembro de 2018. Tal situação impossibilitou o início da coleta das amostras humanas e ambientais em 2018, uma vez que esta ação deve ser realizada simultaneamente.
- O processo de importação da membrana específica (Membrana SS em éster de celulose 3,0µM de poro, 47mm de diâmetro, branca, lisa, 100/Cx) para filtração da água, encontrava-se em fase de desembaraço aduaneiro durante os meses de março a julho de 2019.
- Adequações nos protocolos de extração para melhor recuperação de DNA das amostras.
- Aquisição de amostras controle positivas adequadas para uso em biologia molecular, dos microrganismos sob investigação, para testes piloto dos protocolos a serem utilizados.
- Clima: conclusão dos períodos chuvosos de verão (primeiros meses de 2019) que, ocasionaram alagamento dos cultivos, perda de plantações, impossibilitando a coleta das mesmas. Os produtores retomaram o plantio após o período chuvoso de verão.
- Contato com produtores: devido a diversos fatores como privacidade, desconforto, medo ou experiências prévias ruins com outros pesquisadores, muitos produtores não possuem interesse em contribuir para a pesquisa, outros demonstram disponibilidade, porém em seguida mudam de ideia, dificultando assim a obtenção do número esperado de propriedades participantes na pesquisa.
- Não foi possível utilizar a técnica de Ziehl-Neelsen para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Cyclospora* spp na análise microscópica das amostras fecais.
- A dificuldade de sequenciamento Sanger nas amostras ambientais impediu a realização das análises filogenéticas nas amostras positivas.

Discussão

5. Discussão

Sabe-se que as infecções gastrointestinais parasitárias estão presentes em todo o mundo e os avanços tecnológicos em pesquisa tem contribuído para a melhoria e prevenção da doença, apesar do acesso a essas ferramentas ainda ser muito desigual¹¹. No Brasil, a maioria destas doenças não são de notificação obrigatória por esse motivo, há a dificuldade na quantificação de casos e se eles são existentes em nossa região de estudo. Entretanto anualmente muitos casos ocorrem no país, sendo os casos mais críticos ou com alto número de infectados mais noticiados^{71 72}.

Podemos ver que surtos por parasitas são comuns e casos em água possuem importância.

Das cinco propriedades avaliadas, duas (A e B) recebem água proveniente de riacho. É importante ressaltar que a qualidade das águas está diretamente relacionada com o tratamento de esgoto e Bauru não possui o mesmo. Assim, diversos rios e córregos da cidade recebem efluentes urbanos e agrícolas, o que afeta a qualidade dessas águas utilizadas nos cultivos de hortaliças em geral para irrigação^{58 73}. Os dois locais apresentaram positividade para parasitas em água na análise molecular, bem como para coliformes totais e *E. coli* em altas taxas, sendo o grupo *E. coli* indicativos de contaminação fecal^{74 75}.

A água proveniente dos poços das propriedades C, D e E também foram positivas para coliformes totais, *E. coli* e para *Giardia* spp., *C. cayetanensis* e *Cryptosporidium* spp. Para identificar a origem dessa contaminação o ideal seria observar a estrutura dos poços que podem estar recebendo sujidades ambientais bem como as condições dos reservatórios de C e D no qual a água ficava armazenada, que podem também ser os responsáveis pela contaminação.

Nossos achados de *Giardia* spp., em água de poço também foram identificados em altas taxas em uma comunidade do México⁷⁶ porém quando analisadas em água bruta de rio em outra cidade do estado de São Paulo, apresentou ser menos frequente³⁷. Um estudo na Polônia, apontou ambos tipos de água analisados em nosso estudo (água superficial de reservatórios e de poço artesiano) como fontes de transmissão de *G. duodenalis* para humanos, confirmando a importância da análise de água de ambos

os locais e apresentando que este tipo de contaminação ocorre também nos poços mesmo que estes aparentem ter origens mais seguras de obtenção de água ⁷⁷.

Os resultados obtidos de 20 amostras positivas de hortaliças para três tipos de parasitas corrobora com diversos outros trabalhos no Brasil e no mundo como o estudo realizado por Ismail em 2016 na Jordânia ⁷⁸ que ao analisar alface, tomate, salsinha e pepino detectou maior prevalência de protozoários na alface, em 20% do total da hortaliça e de Rafael e colaboradores em 2017 na região sul do Brasil com 7% de hortaliças contaminadas ⁷⁹.

De acordo com nossos resultados *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e *C. cayetanensis* também foram detectadas nas mãos dos manipuladores que trabalhavam diretamente na plantação das hortaliças. A quantidade de amostras positivas proveniente das mãos, aponta os humanos como sendo uma fonte importante da contaminação dos cultivos nas propriedades, assim como visto por Malhota em trabalhadores de uma faculdade da Índia (2006) ⁸⁰ e por Castello Branco Jr e Rodrigues (1999) ⁴⁷.

A positividade das amostras de fezes para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nos alertam sobre a saúde dos trabalhadores rurais bem como, sobre possíveis casos de contaminação das hortaliças nos casos de má higienização das mãos pelos manipuladores.

Apesar de todos os participantes relatarem não possuir sintomas intestinais indicativos de infecção, durante processamento das amostras fecais, foi observado que o produtor de uma das propriedades possuía fezes com sangue. Tal situação gerou maior atenção a esse caso, uma vez que o indivíduo apresentava infecção por *Giardia* spp. e desta forma, foi aconselhado a procurar acompanhamento médico. Estudos mostram que casos de giardíase não desencadeiam disenteria ²². Assim, é possível que a situação seja proveniente de outro tipo de patologia ou mesmo outro tipo de parasita.

Foi observado que nas propriedades onde obtivemos positividade para as mãos dos manipuladores não obtivemos positividade nas amostras fecais dos mesmos. Já nos casos em que houve positividade nas amostras de fezes do manipulador, não foi detectado os parasitas nas mãos e assim não pudemos estabelecer uma possível relação entre esses dois tipos de amostras. Logo, a positividade da água de lavagem das mãos pode ser em decorrência de contaminação com água de irrigação e da

manipulação de elementos como por exemplo os esterco animais e o descuido na higiene das mãos após essas e outras atividades trazendo consequências importantes que levam a contaminação das hortaliças^{38 47 48}.

Sabe-se que o papel dos indivíduos que manipulam alimentos é de extrema importância na cadeia produtiva de um alimento e a boa higiene das mãos evita surtos alimentares por parasitas intestinais⁸⁰.

Enteroparasitas nas mãos e unhas de manipuladores de alimentos, foram detectados na Índia⁸⁰. Porém, ainda não se pode descartar totalmente os casos de infecção, devido a quantidade de amostras obtidas neste trabalho ser baixa (duas amostras por indivíduo) e considerando que esta população muitas vezes não possui acesso a informação de antiparasitários este apresenta ser um resultado diferente do comumente visto em populações mais simples e rurais como pode ser visto nos resultados obtidos por David e colaboradores (2015), no interior do estado de São Paulo, no qual os grupos estudados de uma comunidade apresentaram 18% de seus indivíduos infectados a partir da análise microscópica das fezes e por biologia molecular.

A presença de animais de criação, bem como, os de companhia soltos no local foi visto na maioria das propriedades participantes de nosso estudo. Essa questão é comumente abordada em estudos com cães positivos para *Taenia* em fezes, que apontam a interferência negativa que esses animais tem para os cultivos agrícolas, uma vez que, muitos parasitas zoonóticos provenientes de espécies bovinas, caninas, felinas, suínas entre outras, podem contaminar água, alimentos e ambiente no qual estão presentes^{19 68 81}.

Ao longo do tempo, mudanças no comportamento humano em relação a animais domésticos e selvagens, exportação de alimentar, saneamento inapropriado e a globalização, facilitaram a disseminação de agentes infecciosos zoonóticos⁸.

A propriedade D, a única localizada na área urbana apresentou ser o local com maior prevalência de amostras positivas em água de irrigação, verduras e da lavagem das mãos dos manipuladores. No local não há presença de animais, o que contribui para diminuir possíveis chances de contaminações por parasitas zoonóticos. Porém, a manipulação de esterco bovino usado como adubo no cultivo, próximo ao reservatório

de água, pode ser a causa mais possível de contaminação da água do reservatório usada na irrigação.

Alguns produtores afirmaram submeter as fezes animais a um tipo de tratamento ao sol para inativar microrganismos e posterior utilizar o material como adubo orgânico. Porém, diversos estudos apontam o fato de que a maioria desses protozoários são muito resistentes as condições químicas e ambientais, sobrevivendo no ambiente por longos períodos de tempo, sendo tolerante até mesmo a desinfecção por cloro^{19 22 24 26 27 28 82}. Estes estudos apoiam o fato de que tais tratamentos não devem funcionar para os protozoários estudados, sendo o uso de esterco animal dessa forma um risco para todos os setores da produção, podendo contaminar solo, água do local e os alimentos produzidos.

O município de Bauru possui muitas propriedades rurais e o comércio de hortaliças e legumes é amplo. De acordo com dados da Prefeitura do município, Bauru realiza 46 feiras semanais, com comércio de produtos e alimentos como as hortaliças vendidas por pequenos produtores locais⁸³. Visto o histórico da qualidade hídrica na cidade com cursos d'água sendo diariamente contaminados com esgoto não tratado que podem ser usados para irrigação, este fato representa risco para os cultivos presentes na cidade.

Em nossos estudos, obtivemos 32% das hortaliças coletadas contaminadas com parasitas patogênicos. Apesar de nossos participantes não fornecerem seus produtos em feiras livres, a suposição de que demais cultivos em Bauru estejam em condições semelhantes aos locais deste estudo, nos alerta para a questão de uma pesquisa ainda maior para analisar a qualidade dessas hortaliças comercializadas nas feiras sendo estes estudos comuns em diversas cidades brasileiras^{42 43 44 45 46}.

O consumo de verduras, é parte importante da alimentação saudável para os seres humanos. Porém o consumo de verduras *in natura* má higienizadas representa um risco para o consumidor, sendo o tema estudado há anos com relatos de contaminação de hortaliças comercializadas em supermercados, feiras livres e restaurantes⁴⁰. Estes trabalhos mostram a tendência desses alimentos como veículo de transmissão de parasitas.

G. duodenalis está entre os parasitas mais prevalentes em amostras ambientais de água ^{37 77} e em hortaliças ^{78 79}. Causador da doença diarreica “giardíase” atualmente estudos como o de Tongerson e colaboradores (2015) reforçam que a giardíase tornou-se uma das 14 doenças parasitárias com maior prioridade no mundo ^{22 84}.

Os achados obtidos em nossas análises apontam presença do protozoário em água, porém houve uma maior prevalência de *Giardia* spp. nas amostras humanas e de hortaliças em relação aos demais parasitas. Estudos semelhantes no estado de São Paulo, demonstram a mesma alta prevalência nos mais diversos tipos de amostras, em fezes de adultos e crianças em Marília⁴⁷ e Lins ⁴⁹ em humanos de uma aldeia de pescadores próximo ao município de Botucatu ⁵⁰ em alfaces ⁴² de São Carlos, Ribeirão Preto ⁴³ e Presidente Prudente ⁴⁴.

C. cayetanensis foi o parasita mais prevalente nas amostras ambientais. Em nosso estudo este protozoário foi detectado em 62,5% (20/33) nas amostras de água de irrigação coletadas e em 34,4% (11/62) das hortaliças. Nossos achados foram obtidos também por Giangaspero e colaboradores (2015) na Itália que detectaram por PCR o protozoário em diferentes tipos de água, inclusive de poço (6,2%), bem como, em hortaliças (12,2%) ⁸⁵.

A teníase em humanos pode ser ocasionada pela ingestão de carne contendo tênia. A cisticercose é um outro tipo de doença e ocorre pela ingestão dos ovos de tênia em alimentos geralmente consumidos crus e que pode vir a apresentar sintomas graves em indivíduos infectados ^{24 47}. Uma amostra 1,6% (1/62) das hortaliças coletadas foi positiva para *Taenia* spp na propriedade C. A *Taenia* spp. é um helminto cujo hospedeiro definitivo é o ser humano ⁶⁸ e por esse motivo tal resultado gera um alerta pois pode ser indicativo de contaminação fecal ainda desconhecida na propriedade e aponta a necessidade de concluir a espécie para um melhor entendimento dos resultados.

Ainda que as amostras humanas obtidas na propriedade não tenham sido positivas para *Taenia* spp., a coleta de uma maior quantidade dessas amostras poderia trazer mais segurança aos nossos resultados, uma vez que foi possível somente a coleta de duas amostras fecais do manipulador deste local. No local também há criação de animais como os cães soltos pelo cultivo, de acordo com o achado de Kohansal e

colaboradores (2017) foi detectado DNA de *Taenia* spp. em fezes de cães que também podem ser responsáveis pela liberação de ovos pelas fezes.

A ocorrência de *Taenia* varia em hortaliças de acordo com o que é observado nos estudos em geral, porém comparado com outros alimentos como legumes e frutas, a chance de detecção desses helmintos continua sendo maior nas verduras ⁷⁸.

Toxoplasmose é a doença causada por *T. gondii* e ocorre em grande parcela da população mundial ^{25 26 27 28}. Em alguns casos pode ocorrer sintomas mais graves como alterações oculares, febre, confusão e em gestantes pode gerar aborto ou anormalidades no desenvolvimento do crânio ²⁷.

Os estudos com uso de técnicas moleculares de PCR para identificação de *T. gondii* vem sendo aplicados nos últimos anos, assim como em nosso estudo. Ainda que este protozoário não tenha sido detectado neste trabalho, sabe-se que *T. gondii* ocorre também em hortaliças sendo que a primeira detecção do protozoário em verduras feita no Paraná ⁴⁵ e em hortaliças de diferentes municípios de Santa Catarina ⁴⁶.

As técnicas para detecção de *Giardia* spp. em água são padronizadas pela OMS ¹⁹ e pela USEPA ³⁸. O uso de técnicas moleculares tem sido aplicado em trabalhos como de David e colaboradores (2015) ⁴⁸ e Neto (2004) ³⁵ sendo esta ferramenta facilitadora da detecção destes e de outros parasitas mais facilmente, não só em amostras clínicas, mas também em amostras ambientais devido sua sensibilidade.

O uso do kit Colilert® no presente estudo, apresentou dados importantes que corroboram com os resultados das análises moleculares. O Colilert é aprovado pela USEEPA® e incluído como método “*standard*” para exame de água e efluentes por três organizações técnicas especialistas no assunto: American Public Health Association® (APHA), American Water Works Association® (AWWA), Water Environment Federation® (WEF) ⁸⁶. Por esse motivo, seus resultados são considerados de extrema importância para um melhor entendimento da situação de qualidade que as águas das propriedades em questão se encontram. Conte e colaboradores (2004) em estudo com águas de poços e vertentes não tratadas no Rio Grande do Sul obtiveram 29,7% desses águas positivas para coliformes totais, valor inferior ao obtido nas amostras de água do presente estudo e 61,7% das amostras contaminados por *E.coli*, resultado estes semelhante ao encontrado em nosso estudo, o que reafirma questões de infiltração de fossas que

podem comprometer o lençol freático, defeitos na canalização de esgoto próximo à poços e cursos d'água que podem resultar nesse tipo de contaminação por bactérias fecais.

A busca por métodos alternativos de desinfecção de água para casos de protozoários resistentes como *Giardia* spp. tem gerado estudos com resultados otimistas para o futuro, como o uso de luz ultravioleta em experimentos e em estações de tratamentos de água a fim de substituir ou melhorar tratamentos físico-químicos convencionais na prevenção contra essas organismos nos recursos hídricos dos municípios ^{16 35}.

Em nosso estudo, foram necessários testes de padronização das etapas moleculares. Para extração, considerando os diferentes tipos de amostras a serem coletadas, foi selecionado o *QIAmp Fast DNA Stool Mini Kit*® que otimizou todo o nosso processo de extração ⁶³ o mesmo é utilizado também para extração de material genético de amostras em outros estudos como apresentado por Dergan ⁸⁷ no qual foi possível recuperar o e-DNA (DNA ambiental) do peixe *Prochilodus argentus* em água de um tanque. Dessa forma, podemos afirmar que o kit permite uma alta sensibilidade para estudos como o nosso, com amostras não fecais.

Outra etapa de grande importância aplicada no presente trabalho para recuperação de uma boa quantidade de DNA dos parasitas foi a implantação de etapas de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho seco a 95°C, no início da extração de DNA. Estas fases parecem ser essenciais em alguns casos e são descritas em muitos artigos que trabalham com esse tipo de microrganismo, nos quais é necessário rompimento mecânico da parede robusta que envolve estes parasitas, para que a extração de DNA seja melhor sucedida ^{68 88}.

Em relação as análises moleculares, a região genética na qual os iniciadores foram usados para detecção dos parasitas investigados precisou de uma avaliação *Cryptosporidium* no presente trabalho foram: COWP uma proteína da parede de oocisto de *Cryptosporidium* e a e SSU rRNA um *locus* de subunidade pequena do gene do RNA ribossômico. Dessa forma, iniciadores usados neste estudo que amplificam essas regiões vem sendo utilizadas em muitos trabalhos há anos, como visto nos estudos de Leetz e colaboradores em 2007 ⁶⁴ e Nichols e colaboradores em água minerais e potável

⁸⁸, Akiyoshi e colaboradores em 2002 em diferentes espécies de hospedeiros ⁸⁹, Pedraza-Dias e colaboradores em 2001 em amostras fecais de animais de criação e seres humanos ⁹⁰ e Spano e colaboradores em 1997 também em humanos e animais ⁹¹.

Para obtenção dos resultados de *Giardia duodenalis* em nossas amostras, foram utilizados iniciadores que amplificam fragmento de uma região da unidade ribossômica região de 16S-rRNA com visto no trabalho de Appelbee e colaboradores (2003) com análise molecular em amostras fecais de bovinos ⁶⁵.

Em nosso estudo não detectamos presença de *T. gondii*, porém conforme visto no estudo de Homan e colaboradores em 2000, o fragmento que se repete mais de 200 vezes no genoma do protozoário, amplificado pelos iniciadores usados também em nossa pesquisa, foi encontrado em todas as 60 cepas de *T. gondii* testadas, reafirmando a sensibilidade e especificidade que esses iniciadores fornecem. Entretanto o número deste parasita nas amostras ambientais pode ser bastante baixo o que dificulta a sua detecção ⁶⁴.

Para *Taenia* spp. detectada uma única vez em nossas amostras de hortaliças foi utilizado iniciadores da região rRNA da subunidade rrns. O mesmo foi usado para análise molecular do helminto em fezes de cães por Kohansal e colaboradores (2017) ⁶⁴.

Para detecção de *C. cayetanensis* utilizamos iniciadores que amplificam fragmento da região ITS-2 do genoma, o qual revelou muitas amostras amplificadas para esse protozoário. Tais iniciadores também foram testados por Lalonde e Gajadhar (2008) em amostras de água de lavagem de hortaliça sendo o parasita detectados ainda que presente um único oocisto na amostra. Estes iniciadores também foram testados quanto a reatividade cruzada com outros protozoários também investigados em nosso estudo sendo: *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., demonstrando assim a boa qualidade dos *primers* o que reforça nossos resultados. Além disso, houve a confirmação dos resultados por meio do sequenciamento ⁶⁷.

Comumente a identificação de parasitas é realizada por meio de exames diretos. Nos últimos anos, o uso da biologia molecular para uma identificação mais sensível e rápida desses parasitas em amostras clínicas e ambientais vem sendo aplicada proporcionando resultados ainda mais satisfatórios quando comparado com a

microscopia como visto no trabalho de Meurs e colaboradores (2017) ⁹² e por DAVID e colaboradores (2015) ⁵⁰ em amostras fecais, Kitajima e colaboradores (2014) em água e que detectaram parasitas intestinais com mais precisão na PCR do que em métodos convencionais ⁹³.

Tal situação pode explicar também a razão pela qual não encontramos parasitas em nossos resultados de microscopia das amostras fecais dos manipuladores. Enquanto que na microscopia a presença de um parasita pode não ser visualizada devido ao conhecimento técnico, baixa carga parasitaria ou a má homogeneização da amostra; na PCR um único parasita pode ser detectado pelo DNA e apresentar positividade na amostra ^{50 92}.

Nas últimas décadas o uso da PCR vem crescendo em todo o mundo, incluindo países em desenvolvimento, proporcionando benefícios que são considerados diferenciais quando comparado aos métodos convencionais de detecção de parasitas em geral como visto nesta presente pesquisa ⁹⁴.

De acordo com Verweij e Stensvold (2014) o método oferece diferentes vantagens como a possibilidade de uma detecção de alto rendimento para uma variedade de alvos parasitas, bacterianos e virais; as amostras podem ser armazenadas e usadas posteriormente, o diagnóstico é altamente sensível e específico; a análise de diversas amostras de uma única vez, parte do processo é automatizado otimizando tempo, pode-se utilizar amostras armazenadas de diferentes origem (clínicas ou ambientais), além de ser possível realizar a caracterização genética e tipagem molecular do material genético da amostra garantindo o reconhecimento de espécies que não podem ser diferenciadas por outros métodos ⁹⁴.

Entretanto sabemos que existem algumas desvantagens. O método também requer controle de qualidade e não é viável em ambientes com poucos recursos por ser caro para a rotina laboratorial quando comparados com técnicas como a microscopia. Também requerem equipamentos e reagentes específicos de alto custo e parasitas não incluídos como alvos não serão detectados. Entretanto uma possibilidade para a melhoria deste fator seria empregar um painel de PCR mais elaborado e / ou para realizar microscopia adicional em todas as amostras enviadas” ⁹⁴.

A gravidade das doenças parasitárias intestinais se dá pela relação entre carga parasitária e resposta imunológica do indivíduo. A grande atenção atualmente está neste tipo de infecção em indivíduos imunocomprometidos como pacientes com aids ou outras doenças infectocontagiosas. Tal situação pode ser observada no estudo de Ahmede e Chowdhary (2015) na Índia que detectaram *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* e *C. cayetanensis* em estudo com pacientes HIV positivos ⁹⁵.

De acordo com os dados do quadro epidemiológico deste trabalho, vemos que três das cinco propriedades rurais destinam suas vendas de hortaliças para merenda escolar. A prevalência de infecção por parasitas intestinais em crianças, também é importante, pois o sistema imunológico ainda está em formação ^{96,97}, representando um risco a venda dessas hortaliças para a alimentação dessas crianças. Logo, é importante a correta higienização desses produtos pela equipe responsável pelo preparo para a merenda das crianças para que não ocorra chances da ingestão de parasitas viáveis nesses alimentos, gerando surtos nas escolas.

Pacientes sob tratamentos de quimioterapia ou transplantes, também tem sua situação de morbidade agravada por estas infecções parasitárias. O estudo de Esteghamati e colaboradores (2019) apresenta *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em pacientes imunodeficientes, seis pacientes com transplante de órgãos confirmados para *C. parvum* e em pacientes com câncer para *Giardia duodenalis* ⁹⁸. Outro estudo em pacientes com hemodiálise por Shehata, Hassanein e Abdul-Ghani (2019) apontaram *Cryptosporidium* nas fezes desses pacientes, bem como, *T. gondii* em maior prevalência no soro dos mesmos comparados com outro grupo saudável ⁹⁹.

Tais doenças apresentadas no presente trabalho podem ser evitadas com medidas preventivas aplicadas aos trabalhadores rurais e outros envolvidos na cadeia produtiva dos alimentos, por meio das atividades de educação em saúde ⁴⁷. Conforme abordado por Molineri e colaboradores (2014) a consciência sobre as zoonoses e doenças parasitárias entre trabalhadores rurais é inadequada sendo as origens, e formas de transmissão dessas doenças pouco conhecidas por essas populações. Profissionais da área de saúde e nutrição tem papel fundamental no fornecimento de informações à essas pessoas por meio de simples atividades educativas e práticas ¹⁰⁰.

Estudos com caracterização genotípica estão em constante crescimento atualmente e são importantes na investigação epidemiológica, proporcionando esclarecimento sobre espécies e subgrupos de microrganismos mais prevalentes em determinados hospedeiros, bem como, detectar microrganismos ainda não descritos na literatura.

Assim como em nosso trabalho nos últimos anos, estudos tem tido o objetivo de realizar caracterização genotípica em parasitas para um melhor conhecimento das espécies, como apresentado nos diferentes trabalhos no Brasil, de Dubey e colaboradores (2006) com *T. gondii* em aves, Araújo e colaboradores em 2011 com detecção de *C. hominis* em água, David e colaboradores (2015) em fezes de humanos e animais. Em nosso estudo não foi possível a realização desta técnica, uma vez que os resultados obtidos no sequenciamento não foram satisfatórios. Entretanto, estudos semelhantes aos nossos, como os citados anteriormente, obtiveram dados importantes sobre espécies de parasitas, reforçando que a utilização deste tipo de tecnologia para investigação de parasitas de saúde pública pode contribuir muito para conhecimento dos tipos mais prevalentes na população e no meio ambiente desses locais.

O Geoprocessamento é formado por um grupo de técnicas que utilizam de informações em determinado espaço geográfico. De acordo com Hino e colaboradores (2006) o georreferenciamento de eventos de saúde pode analisar riscos coletivos relacionados ao meio ambiente ou ao perfil socioeconômico de uma população, já os mapas são ferramentas importantes construídas para exibir a distribuição espacial de um evento e suas causas. O mesmo foi realizado no presente estudo com o objetivo de identificar áreas de risco para os parasitas alvo no município de Bauru, entretanto, devido à baixa adesão de proprietários rurais e a dificuldade de sequenciamento das amostras foi necessário obtivemos a construção de um mapa mais simplificado dos resultados obtidos mas que demonstrou que em todos os locais havia a presença de parasitas em todos os tipos de amostras analisadas ¹⁰¹.

Por esse motivo os achados obtidos a partir dos resultados deste trabalho, reforçam a questão da veiculação de parasitas em águas de irrigação e em hortaliças comercializadas por diferentes produtores rurais para a população do município de Bauru e região representando um risco para a saúde dos consumidores.

Conclusão

6. Conclusão

Foram detectados parasitas importantes em saúde pública em amostras de hortaliças, águas de irrigação, mãos e fezes de trabalhadores rurais das propriedades agrícolas em Bauru, São Paulo.

Na análise molecular, o parasita mais prevalente nas amostras ambientais (alface e água de irrigação) foi *Cyclospora cayetanensis*. *Giardia* spp. foi mais prevalente nas amostras humanas. Foi detectado também *Cryptosporidium* spp. e *Taenia* spp. em menor prevalência nas amostras. *Toxoplasma gondii* não foi detectado.

Duas amostras de água de irrigação puderam ser sequenciadas e apresentaram similaridade genética com *Cyclospora cayetanensis*. A caracterização genotípica e a filogenética das demais amostras, não puderam ser realizadas devido à dificuldade de sequenciamento pelo método Sanger.

O uso de geoprocessamento proporcionou visualizar em conjunto, que todas as propriedades estudadas apresentaram os dois ou mais dos parasitas investigados nas diferentes regiões do município de Bauru.

A veiculação desses parasitas em alimentos pode representar um risco a população consumidora, principalmente crianças, idosos e imunodeprimidos, por serem alimentos frequentemente ingeridos cru e mal higienizados pelos manipuladores de alimentos e consumidores em suas residências.

Os resultados obtidos no presente trabalho, mostram a problemática da presença de parasitas patogênicos de importância em saúde pública em amostras de hortaliças e água de irrigação que são comercializadas no município de Bauru e região. A positividade de parasitas patogênicos nas amostras pode ser proveniente de diferentes origens ambientais com forte interferência pelas atividades humanas.

Referências

7. Referências¹

1. World Health Organization. Zoonoses: neglected zoonotic diseases [Internet]. Geneva: Who; 2019 [citado 18 Set 2019]. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/zoonoses/infections_more/en/
2. Allen T, Murray KA, Zambrana-Torrel C, Morse SS, Rondinini C, Di Marco M, et al. Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. *Nat Commun*. 2017;8(1):1124.
3. Xie T, Liu W, Anderson BD, Liu X, Gray GC. A system dynamics approach to understanding the One Health concept. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184430.
4. Destoumieux-Garzón D, Mavingui P, Boetsch G, Boissier J, Darriet F, Duboz P, et al. The one health concept: 10 years old and a long road ahead. *Front Vet Sci*. 2018;5:14. doi: 10.3389/fvets.2018.00014.
5. Asokan GV, Asokan V. Bradford Hill's criteria, emerging zoonoses, and One Health. *J Epidemiol Glob Health*. 2016;6(3):125-9. doi: 10.1016/j.jegh.2015.10.002.
6. American Veterinary Medical Association. One health [Internet]. Washington: AVMA; 2019 [citado 31 Jan 2020]. Disponível em: <https://www.avma.org/KB/Resources/Reference/Pages/One-Health94.aspx>
7. Center for Disease Control and Prevention. Parasites: water [Internet]. Atlanta: CDC; 2016 [citado 1 Set 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/water.html>
8. Langoni H. Zoonoses and human beings. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2004;10(2):111.
9. Franco RMB, Branco N, Leal DAG. Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. *Rev Patol Trop*. 2012;41(2):119-35.

¹ Segundo normas Vancouver: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references [Internet]. Bethesda: U. S. National Library of Medicine; 2009 [update 2009 May 12; cited 2009 Set 10]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd.uniform_requirements.html

10. Center for Disease Control and Prevention. Parasites: Neglected Parasitic Infections (NPIs) [Internet]. Atlanta: CDC; 2018 [citado 12 Nov 2019]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/npi/index.html>
11. World Health Organization. Prevention and control of intestinal parasitic infections. Geneva: Who; 1987. (Technical Report Series N° 749).
12. World Health Organization. Intestinal worms. The Disease. What are intestinal worms (soil transmitted helminthiasis)? [Internet]. Geneva: Who; 2019 [citado 14 Nov 2019]. Disponível em: https://www.who.int/intestinal_worms/disease/en/
13. Burgess SL, Gilchrist CA, Lynn TC, Petri Jr WA. Parasitic protozoa and interactions with the host intestinal microbiota. *Infect Immun*. 2017;85(8):e00101-17.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Doenças transmitidas por alimentos [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2019 [citado 10 Nov 2019]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>
15. World Health Organization. Estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015 [Internet]. Geneva: Who; 2015 [citado 18 Set 2019]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165eng.pdf>
16. Lima EC, Stamford TLM. *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. *Cienc Saude Colet*. 2003;8(3):791-800.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
18. Torgerson PR, Devleeschauwer B, Praet N, Speybroeck N, Willingham AL, Kasuga F, et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 11 foodborne parasitic diseases, 2010: a data synthesis. *PLoS Med*. 2015;12(12):e1001920. doi: 10.1371 / journal.pmed.1001920.
19. World Health Organization. Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*): guidelines for drinking-water quality [Internet]. Geneva: Who; 2017 [citado 1 Set 2017]. Disponível em: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob5.pdf

20. Center for Disease Control and Prevention. Parasites – *Cryptosporidium* (also known as “*Crypto*”) [Internet]. Atlanta: CDC; 2019 [citado 1 Ago 2019]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/>
21. São Paulo (Estado). Secretaria da Saúde de São Paulo. Coordenadoria dos Institutos de Pesquisa- CIP. Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE. Manual das doenças transmitidas por alimentos- *Cryptosporidium parvum*/Criptosporidiose [Internet]. São Paulo: Secretaria da Saúde; 2002 [citado 13 Nov 2019]. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/_doc/parasitas/ifnet_cryptos.pdf
22. Center for Disease Control and Prevention. Parasites – *Giardia* [Internet]. Atlanta: CDC; 2015 [citado 10 Fev 2019]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/>
23. Center for Disease Control and Prevention. Parasites - Cyclosporiasis (Cyclospora Infection) [Internet]. Atlanta: CDC; 2019 [citado 10 Fev 2019]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/index.html>
24. Center for Disease Control and Prevention. Parasites – Taeniasis [Internet]. Atlanta: CDC; 2013 [citado 15 Maio 2019]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/taeniasis/>
25. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet [Internet]. 2004 [citado 8 Set 2018];363(9425):1965-76. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(04\)16412-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(04)16412-X/fulltext)
26. Frenkel JK, Hassanein KM, Hassanein RS, Brown E, Thulliez P, Quintero-Nunez R. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. Am J Trop Med Hyg. 1995;53(5):458-68.
27. Dubey JP, Gennari SM, Labruna MB, Camargo LM, Vianna MC, Marcet PL, et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. J Parasitol. 2006;92(1):36-40.

28. Center for Disease Control and Prevention. Parasites - Toxoplasmosis (Toxoplasma infection) [Internet]. Atlanta: CDC; 2018 [citado 20 Jun 2019]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html>
29. Brasil. Presidência da República. Lei nº 11.445, de 5 de Janeiro de 2007. Estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico. Diário Oficial da União. 11 Jan 2007; Sec. 1.
30. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de Setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.
31. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos [Internet]. Brasília: Anvisa; 2001 [citado 10 Set 2019]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b
32. Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Países - Brasil - Indicadores sociais [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2019 [citado 12 Nov 2019]. Disponível em: <https://pais.es.ibge.gov.br/#/dados/brasil>
33. Trata Brasil. Saneamento - Principais estatísticas - Esgoto [Internet]. São Paulo: Trata Brasil; 2019 [citado 30 Out 2019]. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/saneamento/principais-estatisticas/no-brasil/esgoto>
34. Muller APB. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium*, spp, em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1999.
35. Cantusio Neto R. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil [dissertação]. Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas; 2004.
36. Stancari RCA, Correia M. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp em mananciais e águas de abastecimento público. Rev Inst Adolfo Lutz. 2010;69(4):453-60.
37. Cantusio Neto R, dos Santos LU, Sato MI, Franco RM. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, southeast Brazil. Water Sci

Technol [Internet]. 2010 [citado 30 Out 2019];62(1):217-22. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20595774>

38. United States Environmental Protection Agency. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA [Internet]. Cincinnati: EPA; 2005 [citado 3 Set 2017]. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-1623.pdf>
39. Araújo RS, Dropa M, Fernandes LN, Carvalho TT, Sato MIZ, Soares RM, et al. Genotypic characterization of *Cryptosporidium hominis* from water samples in São Paulo, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2011;85(5):834-8.
40. Santos AO. Investigação epidemio-parasitológica em hortaliças comercializadas em feiras livres, mercados e restaurantes do Distrito Federal [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2007.
41. Rosa NCE, Lellis JR, Pacheco AG, Branco Jr AC. Ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas em feiras livres do Município de Bauru/SP. In: 16o Congresso Nacional de Iniciação Científica CONIC – SEMESP; 2016; Guarulhos, Brasil. Guarulhos: CONIC – SEMESP; 2016.
42. Saraiva N, Ballesteros LGB, Povêa AM, Anibal FF. Incidência da contaminação parasitária em alfaces nos municípios de Araraquara (SP) e São Carlos (SP). Rev Uniara [Internet]. 2005 [citado 3 Set 2017];9(16):213-8. Disponível em: <http://www.revistarebram.com/index.php/revis-tauniara/article/view/298>
43. Takayanagui OM, Febrônio LHP, Bergamini AM, Okino MHT, Castro e Silva AAMC, Santiago R et al. Monitoring of lettuce crops of Ribeirão Preto, SP, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2000 [citado 3 Set 2019];33(2):169-74. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v33n2/v33n2a02.pdf>
44. Santarém VA, Giuffrida R, Chesine PAF. Contaminação de hortaliças por endoparasitas e *Salmonella* spp. em Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. Colloq Agrar. 2012;8(1):18-25.
45. Marchioro AA, Tiyo BT, Colli CM, de Souza CZ, Garcia JL, Gomes M, et al. First detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the fresh leaves of vegetables in South America. Vector Borne Zoonotic Dis. 2016;16(9):624-6.

46. Ferreira FP, Caldart ET, Freire RL, Mitsuka-Breganó R, Freitas FM, Miura AC, et al. The effect of water source and soil supplementation on parasite contamination in organic vegetable gardens. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2018;27(3):327-37.
47. Castello Branco Jr A, Rodrigues JC. Importância de aspectos sanitários e educacionais na epidemiologia de enteroparasitoses em ambientes rurais. *Rev Bras Anal Clin.* 1999;31(2):87-90.
48. Silva LP, Silva EJ, Silva RMG. Diagnóstico parasitológico de horticultores no monitoramento da contaminação parasitária em ambientes rurais. *Biosci J [Internet].* 2010 [citado 11 Set 2017];26(4):648-52. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/127152>
49. Malta RCG, Waib CM, Castello Branco Jr A. Investigação epidemiológica sobre enteroparasitos em crianças em idade pré-escolar no município de Lins (SP). *Rev Patol Trop.* 2002;31(1):109-20.
50. David EB, Guimarães S, de Oliveira AP, Oliveira-Sequeira TCG, Bittencourt GN, Nardi ARM, et al. Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors.* 2015;8:103. doi: 10.1186/s13071-015-0714-8.
51. David EB. Prevalência de parasitas intestinais e caracterização genotípica de *Giardia duodenalis* em creche do município de Pratânia, estado de São Paulo. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2011.
52. Shen Z, Zhu C, Quan Y, Yuan W, Wu S, Yang Z, et al. Update on intestinal microbiota in Crohn's disease 2017: mechanisms, clinical application, adverse reactions, and outlook. *J Gastroenterol Hepatol.* 2017;32(11):1804-12. doi: 10.1111/jgh.13861.
53. Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd SG. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr Opin Microbiol.* 2016;34:47-52. doi: 10.1016/j.mib.2016.07.019.
54. Cheung DA, Langshaw A, Rivera-Rivera E. Cryptosporidium diagnosed on endoscopic biopsy in a paediatric patient with inflammatory bowel disease. *BMJ Case Rep.* 2018; 2018. doi: 10.1136/bcr-2017-222015.
55. Franco RMB. Controle de qualidade: metodologia de detecção de ovos de helmintos em hortaliças (parte 3) [Internet]. In: Mini-curso teórico e prático:

detecção de ovos de helmintos em hortaliças. Campinas: Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas; 2016 [citado 19 Jan 2019]. Disponível em: [https://www2.ib.unicamp.br/branco/parasit/spp/Mini%20 curso/3%20Mini-Curso Controle %20de%20Qualidade%20SPP%202016.pdf](https://www2.ib.unicamp.br/branco/parasit/spp/Mini%20curso/3%20Mini-Curso%20Controle%20de%20Qualidade%20SPP%202016.pdf)

56. Franco RMB, Rocha-Eberhardt R, Cantusio Neto R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2001;43(2):109-11.
57. Prefeitura Municipal de Bauru. Conheça a cidade: dados demográficos [Internet]. Bauru; 2019 [citado 13 Nov 2019]. Disponível em: <http://www2.bauru.sp.gov.br/bauru.aspx?m=2>
58. Departamento de Água e Esgoto. Água. Qualidade. Mananciais- Preservação dos Mananciais [Internet]. Bauru: DAE; 2014 [citado 5 Dez 2018]. Disponível em: <http://www.daebauru.sp.gov.br/2014/agua/agua.php?secao=qualidade&pagina=21>
59. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. P R J Public Health Trop Med [Internet]. 1934 [citado 9 Set 2019];9:283-91. Disponível em: [http://biblioteca.rcm.upr.edu:8080/jspui/bitstream/2010/809/1/The%20Sedimentation %20Concentration.pdf](http://biblioteca.rcm.upr.edu:8080/jspui/bitstream/2010/809/1/The%20Sedimentation%20Concentration.pdf)
60. Neves PA. Manual Roca técnicas de laboratório: fezes. São Paulo: Roca; 2010.
61. IDEXX Laboratories. Colilert [Internet]. Westbrook: IDEXX; 2019 [citado 7 Abril 2019]. Disponível em: <https://www.idexx.com.br/files/colilert-procedure-en.pdf>
62. QIAGEN. QIAamp® fast DNA stool mini kit: quick-start protocol. Hilden: QIAGEN; 2017.
63. QIAGEN. QIAamp® fast DNA stool mini kit [Internet]. Hilden: QIAGEN; 2018 [citado 10 Abril 2018]. Disponível em: <https://www.qiagen.com/gb/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/qiaamp-dna-stool-mini-kit/#orderinginformation>

64. Leetz AS, Sotiriadou I, Ongerth J. An evaluation of primers amplifying DNA targets for the detection of *Cryptosporidium* spp. using *C. parvum* HNJ-1 Japanese isolate in water samples. *Parasitol Res.* 2007;101(4):951-62.
65. Appelbee AJ, Frederick LM, Heitman TL, Olson ME. Prevalence and genotyping of *Giardia* duodenalis from beef calves in Alberta, Canada. *Vet Parasitol.* 2003;112(4):289-94.
66. Homan WL, Vercammen M, de Braekeller J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol.* 2000;30(1):69-75.
67. Lalonde LF, Gajadhar AA. Highly sensitive and specific PCR assay for reliable detection of *Cyclospora cayentanensis* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(14):4354-8.
68. Kohansal MH, Nourian A, Haniloo A, Fazaeli A. Molecular detection of *Taenia* spp. in dogs' feces in Zanzan Province, Northwest of Iran. *Vet World.* 2017;10(4):445-9.
69. Promega. GoTaq® Green Master Mix Protocol [Internet]. São Paulo: Promega; 2019 [citado 13 Nov 2019]. Disponível em: <https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf?la=em>
70. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547-9.
71. G1. Vigilância confirma 45 casos de toxoplasmose em SP desde março [Internet]. São Paulo; 2019 [citado 10 Maio 2019]. Disponível em: <https://g1.globo.com/sp/sao-paulo/noticia/2019/05/14/vigilancia-confirma-45-casos-em-3-surtos-de-toxoplasmose-em-sp-desde-marco.ghtml>
72. Governo Municipal de Cascavel. Secretaria Municipal de Saúde – SESAU. Casos de diarreia voltaram aos índices de normalidade [Internet]. Cascavel: SESAU; 2019 [citado 13 Ago 2019]. Disponível em: <https://cascavel.atende.net/?pg=subportal&chave=13#!/tipo/noticia/valor/31525>
73. Departamento de água e esgoto. Esgoto. Tratamento de esgoto em Bauru [Internet]. Bauru: DAE; 2018 [citado 5 Dez 2018]. Disponível em:

<http://www.daebauru.sp.gov.br/2014/esgoto/esgoto.php?secao=tratamento&pagina=11>

74. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
75. Conte VD, Colombo M, Zanrosoos AV, Salvador M. Qualidade microbiológica de águas tratadas e não tratadas na região nordeste do Rio Grande do Sul. *Infarma*. 2004;16(11):83-4.
76. Balderrama-Carmona AP, Gortáres-Moroyoqui P, Álvarez-Valencia LH, Castro-Espinoza L, Balderas-Cortés JJ, Mondaca-Fernández I, et al. Quantitative microbial risk assessment of *Cryptosporidium* and *Giardia* in well water from a native community of Mexico. *Int J Environ Health Res*. 2015;25(5):570-82. doi: 10.1080/09603123.2014.989492.
77. Lass A, Szostakowska B, Korzeniewski K, Karanis P. Detection of *Giardia intestinalis* in water samples collected from natural water reservoirs and wells in northern and north-eastern Poland using LAMP, real-time PCR and nested PCR. *J Water Health*. 2017;15(5):775-87. doi: 10.2166/wh.2017.039.
78. Ismail Y. Prevalence of parasitic contamination in salad vegetables collected from supermarkets and street vendors in Amman and Baqa'a – Jordan. *Pol J Microbiol [Internet]*. 2016 [citado 5 Dez 2018];65(2):201-7. Disponível em: <http://www.pjm.microbiology.pl/archive/vol6522016201.pdf>
79. Rafael K, Marchioro AA, Colli CM, Tiyo BT, Evangelista FF, Bezagio RC, et al. Genotyping of *Giardia duodenalis* in vegetables cultivated with organic and chemical fertilizer from street markets and community vegetable gardens in a region of Southern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2017;111(12):540-5.
80. Malhotra R, Lal P, Prakash SK, Daga MK, Kishore J. Study of hand hygiene and enteroparasite infestation among food handlers working in a medical college of North India. *Indian J Pathol Microbiol*. 2006;49(2):296-301.
81. Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol*. 2000;30(12-13):1379-93.
82. Torgerson PR, Devleeschauwer B, Praet N, Speybroeck N, Willingham AL, Kasuga F, et al. World Health Organization estimates of the global and regional

disease burden of 11 foodborne parasitic diseases, 2010: a data synthesis. PLoS Med. 2015;12(12):e1001920. doi: 10.1371/journal.pmed.1001920.

83. Prefeitura Municipal de Bauru. Secretaria Municipal de Agricultura e Abastecimento - SAGRA. Feiras: feiras livres e outras [Internet]. Bauru: SAGRA; 2019 [citado 23 Abr 2019]. Disponível em: <http://www2.bauru.sp.gov.br/sagra/feiras.aspx>
84. World Health Organization. Second formal meeting of the Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group (FERG): appraising the evidence and reviewing initial results. Geneva: WHO; 2009 [citado 23 Abr 2019]. Available: <http://www.who.int/foodsafety/publications/ferg2/en/>
85. Giangaspero A, Marangi M, Koehler AV, Papini R, Normanno G, Lacasella V, et al. Molecular detection of Cyclospora in water, soil, vegetables and humans in southern Italy signals a need for improved monitoring by health authorities. Int J Food Microbiol. 2015;211:95-100. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.00.
86. Standard Methods. For the examination of water and wastewater [Internet]. 2020 [citado 22 Jan 2020]. Disponível em: <https://www.standardmethods.org/aboutsm>
87. Dergam CG. Condições de uso do eDNA (environmental DNA) no monitoramento de *Prochilodus argenteus* [dissertação]. Belo Horizonte: Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; 2016.
88. Nichols RAB, Campbell BM, Smith HV. Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in United Kingdom noncarbonated natural mineral waters and drinking waters by using a modified nested PCR-Restriction fragment length polymorphism assay. Appl Environ Microbiol. 2003;69(7):4183-9. doi: 10.1128/AEM.69.7.4183-4189.2003.
89. Akiyoshi DE, Feng X, Buckholt MA, Widmer L, Tzipori S. Genetic analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype 1 isolate passaged through different host species. Infect Immun. 2002;70(10):5670-5.
90. Pedraza-Diaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. Emerg Infect Dis. 2001;7(1):49-56.

91. Spano F, Putignani G, McLauchlin J, Casemore DP, Crisanti A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. FEMS Microbiol Lett. 1997;150(2):209-17.
92. Meurs L, Polderman AM, Melchers NVSV, Brienen EAT, Verweij JJ, Groosjohan B., et al. Diagnosing polyparasitism in a high-prevalence setting in beira, Mozambique: Detection of Intestinal Parasites in Fecal Samples by Microscopy and Real-Time PCR. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(1):e0005310. doi: 10.1371/journal.pntd.0005310.
93. Kitajima M, Haramoto E, Iker BC, Gerba CP. Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona. Sci Total Environ. 2014;484:129-36. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.036.
94. Verweij JJ, Stensvold CR. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. Clin Microbiol Rev. 2014;27(2):371-418. doi: 10.1128/CMR.00122-13.
95. Ahmed NH, Chowdhary A. Pattern of co-infection by enteric pathogenic parasites among HIV sero-positive individuals in a Tertiary Care Hospital, Mumbai, India. Indian J Sex Transm Dis AIDS. 2015;36(1):40-7. doi: 10.4103/2589-0557.156707.
96. Arbex APO. Infecção por *Giardia duodenalis* e diversidade da microbiota intestinal em crianças de 0 a 6 anos de idade [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2019.
97. Gonçalves AL, Belizário TL, Pimentel JB, Penatti MP, Pedroso RS. Prevalência de parasitas intestinais em pré- escolares da região de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44 (2):191-3.
98. Esteghamati A, Khanaliha K, Bokharaei-Salim F, Sayyahfar S, Ghaderipour M. Prevalence of intestinal parasitic infection in cancer, organ transplant and primary immunodeficiency patients in Tehran, Iran. Asian Pac J Cancer Prev. 2019;20(2):495-501. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.2.495.
99. Shehata AI, Hassanein F, Abdul-Ghani R. Opportunistic parasitoses among Egyptian hemodialysis patients in relation to CD4+ T-cell counts: a comparative study. BMC Infect Dis. 2019;19:480. doi: 10.1186/s12879-019-4110-4.

100. Molineri AI, Signorini ML, Tarabla HD. [Knowledge of zoonoses transmission routes and of the species concerned among rural workers]. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46(1):7-13. doi: 10.1016/S0325-7541(14)70041-0.
101. Hino P, Villa TCS, Sasaki CM, Nogueira JÁ, Santos CB. Geoprocessing in health área. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2006;14(6):939-43. doi: <https://doi.org/10.1590/S0104-11692006000600016>.

Appendice

8. APÊNDICES

APÊNDICE 1- Termo de consentimento livre e esclarecido

Via do participante



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CENTRO DE LABORATÓRIOS REGIONAIS II - BAURU
NÚCLEO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Rua Rubens Arruda, quadra 6 – Centro - Bauru/SP – 17015-110
☎ 14-32231175 – fax: 14-32231002

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) senhor (a) está sendo convidado a participar da pesquisa de nome "Investigação molecular, caracterização genotípica de parasitas patogênicos e distribuição espacial por geoprocessamento em amostras ambientais e humanas no município de Bauru-SP."

Muitas doenças intestinais podem ser causadas por parasitas. Essas doenças são mais comuns em crianças, idosos e pessoas com outros tipos de doenças (como o câncer). Essas pessoas caso sejam infectadas com parasitas intestinais podem ter doenças graves, que necessitam de tratamento e assistência médica.

Este documento informa que o projeto citado acima tem o objetivo de investigar a presença de parasitas intestinais em hortaliças, águas de irrigação e em fezes e mãos dos participantes (por meio da raspagem das mãos com espátula ou pela lavagem das mãos em sacos plásticos com água). As amostras fornecidas serão coletadas na propriedade rural na qual trabalha/mora, semanalmente, por cerca de 2 meses e enviadas para exames laboratoriais, sendo guardadas até o fim das análises, **sem custo algum**. O (a) senhor (a) terá acesso a um relatório geral dos resultados dos testes realizados com as amostras ambientais e humanas e será orientado, caso necessário, quanto a melhoria da qualidade da água utilizada e do alimento produzido. Caso o exame das amostras humanas apresente algum parasita, os pesquisadores ficam responsáveis por orientar os voluntários a procurar tratamento médico.

Fica comunicado que, desta pesquisa, o (a) senhor (a) pode esperar alguns benefícios, tais como: auxílio profissional e gratuito de pessoas especializadas que podem ajudar a melhorar a qualidade do alimento que é comercializado. Análises laboratoriais para a água utilizada e para a verdura produzida. Exames laboratoriais para observar alguma infecção por parasitas intestinais. Relatório fornecido indicando a boa qualidade das hortaliças.

Dessa forma, fica esclarecido a participação voluntária do (a) senhor (a) nesta pesquisa, sendo possível não participar ou se retirar sem qualquer prejuízo. Sendo informado que, qualquer dúvida que o (a) senhor (a) ou seus familiares possam ter, podem ser respondidas pela pesquisadora responsável, Dra. Virgínia Bodelão Richimi Pereira, nos telefones e endereços abaixo.

Portanto, dou meu consentimento livre e esclarecido.

Nome do Participante _____

Assinatura do Participante ou Responsável _____

Nome dos Pesquisadores: Virgínia Bodelão Richimi Pereira / Natássia C. Esposito Rosa

Assinatura do Pesquisador Responsável _____

Endereço: Rua Rubens Arruda, Q6, Centro, Bauru-SP.

Telefone: 14 - 32350209

Data:...../...../.....

APÊNDICE 2 - Questionário do produtor participante

Questionário do Produtor Participante

1. Nome:
2. Telefone:
3. Quantas Feiras faz por semana? Qual local? _____

4. Tipo de cultura: Solo Estufa Hidropônica
5. Tipos de hortaliças que cultiva:
 2 a 3 tipos
 4 a 6 tipos
 Mais de 7 tipos
6. Para irrigação utiliza água de:
 torneira / hidropônia
 poço artesiano
 mina/ nascente
 riacho
 outra _____
7. Utiliza adubo orgânico?
 Inorgânico
 Orgânico → Caseiro ou comercial? _____
8. Faz uso de agrotóxicos? Quais? _____

9. Vende as hortaliças para outros municípios? Quais? _____

10. Cria animais na propriedade? Quais? _____

11. Como é feita a coleta, armazenamento e transporte das hortaliças até a feira?

APÊNDICE 3 - Protocolo de coleta amostras de água

Métodos de Coleta

- EM LABORATÓRIO → Lavar o galão de coleta com 100 ml de solução de eluição, secar à temperatura ambiente e vedar a tampa até o momento da coleta (limpar o gargalo com álcool 70% antes e depois da coleta)
- EM CAMPO

Coleta de água bruta (reservatórios, rios, lagos)

- Selecionar um local seguro para coleta da água e colocar luva. Coletar em um único ponto e de uma única vez.

Coletar primeiramente a amostra superficial em frasco para microbiologia (até máx 30 cm abaixo da lâmina da água)

- Com galão de 2 L, remover a tampa e mergulha-lo, colocando a abertura abaixo da superfície da água até 30 cm de profundidade
- Ao atingir a marcação de 2L, fechar o galão com tampa e papel alumínio



Coleta de água tratada (torneira, poço artesiano)

- Desinfetar a torneira/mangueira com solução de hipoclorito de sódio 100mg/L em gaze
- Abrir a torneira a meia secção e deixar escoar por 2 min.



- Posicionar o frasco de microbiologia enche-lo sem que tenha contato com a torneira.
- Encher o galão até 2 L e fecha-lo com a tampa e papel alumínio.

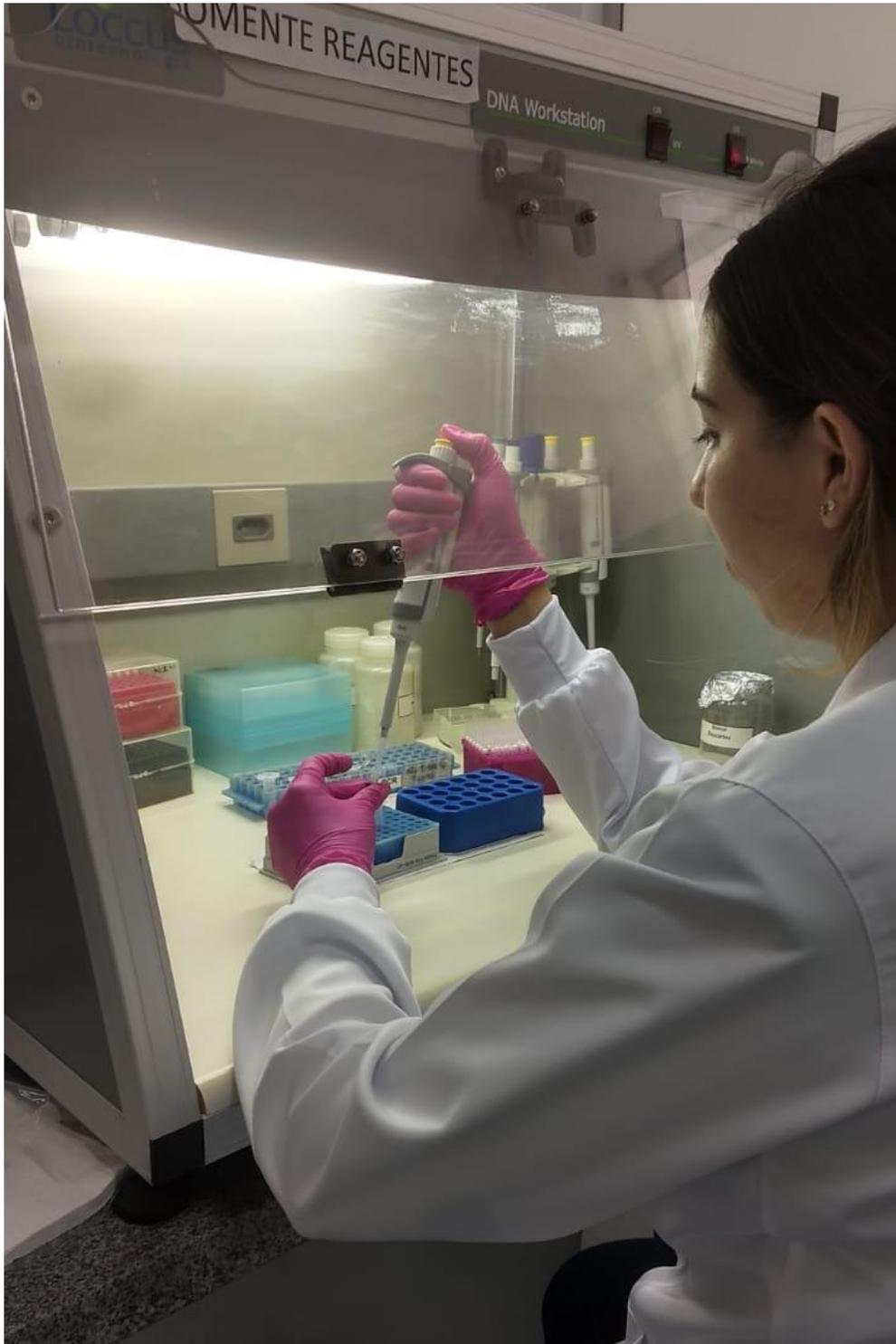
Referência: São Paulo. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidas. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.

APÊNDICE 4- Transporte e armazenamento e registro

- Após coleta das amostras, preencher as etiquetas das embalagens com: data de coleta e nome da propriedade.
- Conferir as informações antes de retirar o material da propriedade
- Registrar a localização do local com auxílio de GPS
- O transporte deve ser sob refrigeração (entre -10°C e 5°C) em caixas térmicas com gelo até o laboratório
- No laboratório, as amostras devem ser mantidas refrigeradas até o início das análises (não ultrapassar 24 horas).

Referência: São Paulo. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidas. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.

APÊNDICE 5- Preparo do mix para realização da reação em cadeia da polimerase.



FONTE: ARQUIVO PESSOAL.

APÊNDICE 6- Material educativo sobre parasitas e doenças alimentares entregue aos produtores participantes da pesquisa (página 1 e 2)

→ Toxoplasmose

Agente causador: *Toxoplasma gondii*

O que a doença causa nos humanos e animais: geralmente não causa sintomas em animais e nem indivíduos saudáveis. Quando aparecem sintomas são leves (dor no corpo). Pode gerar lesões oculares que geram visão embaçada ou cegueira. Em gestantes pode gerar doenças nos bebês e aborto. .

Transmissão: água e alimentos contaminados com fezes de felinos (gatos) ou ingestão da carne de animais (ex: suínos, aves) que tiveram o parasita. Contato com o ambiente (solo ou areia) contaminados com fezes de felinos.

Como evitar:

- Não coma carne crua ou mal passada. Cozinhar em fogo alto.
- Não beba leite não pasteurizados
- Lave frutas, legumes e verduras em água potável e coloque-os de molho em produtos desinfetantes (ex: água sanitária) por 15 minutos, caso deseje comê-los crus. Enxague bem em água corrente antes de ingerir;
- Lave utensílios da cozinha entre a preparação de alimentos crus
- Evite beber água não potável;
- Lave bem as mãos antes das refeições;
- Alimente os gatos se possível com rações comerciais;
- Se for gestante evite contato com gatos de rua.

→ Teníase

Agente causador: *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Taenia asiática*

O que a doença causa nos humanos e animais: dor abdominal, perda de apetite, perda de peso e desconforto intestinal.

Transmissão: ingestão de carne crua ou mal cozida.

Como evitar:

- Não coma carne crua ou mal passada. Cozinhar em fogo alto.

→ Cisticercose

Agente causador: *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Taenia asiática*

O que a doença causa nos humanos e animais: dor abdominal, perda de apetite, perda de peso, desconforto intestinal, convulsões entre outros.

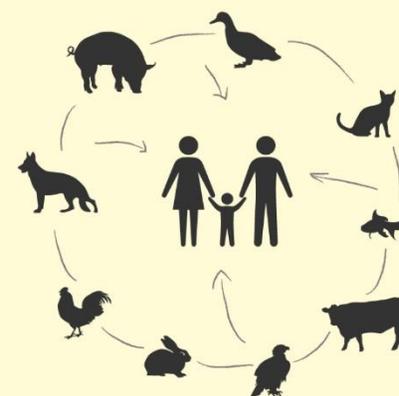
Transmissão: ingestão de frutas, legumes e hortaliças contaminadas com ovos de *Taenia*.

Como evitar:

- Evite beber água não potável;
- Lave frutas, legumes e verduras em água potável e coloque-os de molho em produtos desinfetantes (ex: água sanitária) por 15 minutos, caso deseje comê-los crus. Enxague bem em água corrente antes de ingerir;
- Lave bem as mãos com água e sabão após ir ao banheiro, antes de manipular alimentos ou fazer as refeições;



Papel dos Parasitas na Transmissão de Doenças Alimentares



Muitas doenças podem ser causadas por água e alimentos contaminados por parasitas, seres microscópicos que podem ocasionar infecções em humanos e animais em todo o mundo. As doenças mais comuns são: Giardíase, Criptosporidiose, Ciclosporiase, Toxoplasmose, Teníase e Cisticercose.

→ Giardíase

Agente causador: *Giardia duodenalis*

O que a doença causa nos humanos e animais: diarreia, flatulências, cólicas estomacais ou abdominais, náusea e/ou vômito, desidratação (perda de líquidos e falta de absorção de vitaminas). Crianças podem ter atraso no crescimento físico e mental.

Transmissão: água, alimento e solo contaminados com fezes de humanos ou animais infectados.

Como evitar:

- Lave bem as mãos com água e sabão após ir ao banheiro, antes de manipular alimentos ou fazer as refeições e após contato com animais;
- Evite beber água não potável;
- Lave frutas, legumes e verduras em água potável e coloque-os de molho em produtos desinfetantes (ex: água sanitária) por 15 minutos, caso deseje come-los crus. Enxague bem em água corrente antes de ingerir.

→ Criptosporidiose

Agente causador: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis*, *C. felis*, *C. canis* entre outros.

O que a doença causa nos humanos e animais: diarreia aquosa, cólicas ou dores de estômago, desidratação, náusea e/ou vômito, febre e perda de peso.

Transmissão: a forma mais comum é pela água e alimentos contaminados com fezes humanas e animais. Mas também pode ser proveniente do contato com animais (vaca ou bezerro infectados) e contato com esgoto.

Como evitar:

- Lave bem as mãos com água e sabão após ir ao banheiro, antes de manipular alimentos ou fazer as refeições e após contato com animais;
- Evite beber água não potável;
- Lave frutas, legumes e verduras em água potável e coloque-os de molho em produtos desinfetantes (ex: água sanitária) por 15 minutos, caso deseje come-los crus. Enxague bem em água corrente antes de ingerir;
- Evite nadar em águas (rios, lagos) desconhecidos;
- Evite o manuseio de alimentos quando estiver com diarreia;
- Não beba leite não pasteurizado.

→ Ciclosporiase

Agente causador: *Cyclospora caytanensis*

O que a doença causa nos humanos e animais: diarreia aquosa (mais comum), perda de apetite, perda de peso, cólicas, inchaço, náusea e/ou vômito, fadiga e febre baixa.

Transmissão: a forma mais comum é pela água e alimentos contaminados com fezes humanas e animais. Mas também pode ser proveniente do contato com animais (vaca ou bezerro infectados) e contato com esgoto.

Como evitar:

- Lave verduras em água corrente e frutas, legumes também com sabão e coloque-os de molho em produtos desinfetantes (ex: água sanitária) por 15 minutos, caso deseje come-los crus. Enxague bem em água corrente antes de ingerir. Lave utensílios da cozinha entre a preparação de alimentos crus (legumes, verduras) e carnes;
- Evite beber água não potável;
- Evite o manuseio de alimentos quando estiver com diarreia;

APÊNDICE 7 - Figuras obtida das propriedades participantes da pesquisa.



Figura 16- Aves em propriedade rural de Bauru - SP. Fonte: Arquivo Pessoal



Figura 17- Caninos em propriedade rural de Bauru- SP. Fonte: Arquivo Pessoal



Figura 18- Reservatório de água utilizada na irrigação de hortaliças em propriedade rural de Bauru -SP. Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 19- Cultivo de alface crespa em propriedade rural de Bauru- SP. Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 20- Cultivo de hortaliças em propriedade rural de Bauru- SP. Fonte: Google Imagem

Anexo

9. ANEXOS

ANEXO 1 - Autorização Conselho Técnico Científico (CTC) do Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO – CTC / IAL



São Paulo, 06 de Maio de 2019

Projeto: CTC 03-K / 2018

“Investigação molecular, caracterização genotípica e geoprocessamento de parasitas patogênicos em amostras ambientais e humanas no município de Bauru-SP..”

Coordenação: Virginia Bodelão Richini Pereira

Comunicamos que o projeto CTC-IAL 03-K/2018 foi cadastrado no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico e após aprovação quanto aos aspectos éticos pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (Parecer nº. 3.088.168– CAAE nº 91320218.9.0000.0059).

Atenciosamente,

ADRIANA BUGNO
Presidente do CTC/IAL

1ª Via: Coordenador
2ª Via: Diretor de Núcleo
3ª Via: Diretor de Centro
4ª Via: CTC

ANEXO 2 - Autorização Comitê de Ética em Pesquisa- CEP

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação molecular, caracterização genotípica de parasitas patogênicos e distribuição espacial por geoprocessamento em amostras ambientais e humanas no município de Bauru-SP.

Pesquisador: Virgínia Bodelão Richini Pereira

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 91320218.9.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.088.168

Apresentação do Projeto:

Idem ao parecer do CEPIAL de 15/08/2018, nº 2.823.959.

Objetivo da Pesquisa:

Idem ao parecer do CEPIAL de 15/08/2018, nº 2.823.959.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Idem ao parecer do CEPIAL de 27/09/2018, nº 2.922.518.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Idem ao parecer do CEPIAL de 27/09/2018, nº 2.922.518.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados e de acordo: idem ao parecer anterior do CEPIAL de 15/08/2018, nº 2.823.959, parecer nº 2.922.518, de 27/09/2018 e parecer nº 3.036.055, de 23/11/2018.

O TCLE foi revisto e está de acordo.

Recomendações:

Nada a declarar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora atendeu satisfatoriamente a pendência do parecer consubstanciado de 23 de

Endereço: Av. Dr. Amaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer 3.088.168

novembro de 2018 em relação ao texto do TCLE que foi revisto conforme o Manual de Orientação do CONEP, versão 01, 2015.

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo colegiado do CEPIAL em reunião ordinária de 13 de dezembro de 2018 do ponto de vista ético a luz da Resolução CNS 466/2012.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

- a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa;
- b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1142214.pdf	05/12/2018 09:39:43		Aceito

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

ANEXO 3 – Protocolo Coleta Hortaliças

Coleta de Hortaliças

- Selecionar um pé grande de alface crespa, aleatoriamente na cultura da propriedade rural. Com luvas, coletar o pé de alface e colocá-lo em saco plástico limpo, fechando a abertura com fita adesiva.

Concentração das Amostras de Hortaliças

1. De cada amostra de alface serão retiradas partes das folhas mais externas até a pesagem de 30g
2. Em seguida, as folhas devem ser colocadas em sacos plásticos limpos e sem uso prévio, adicionando-se às folhas 200 ml da solução de glicina 1M
3. Fechar bem o plástico e agita-lo manualmente por 3 minutos
4. Após agitação, retirar as folhas do saco plástico com uma pinça, sacudindo-as levemente para que a solução de lavagem permaneça dentro do saco plástico.
5. Peneirar o líquido restante (amostra) em cálice de sedimentação e deixar em repouso por 2 horas com o cálice tampado com papel toalha e fita adesiva
6. Após tempo de sedimentação, descartar o sobrenadante com auxílio de pipeta Pasteur, deixando cerca de 10 ml do sedimento e transferi-lo para tubo de centrifuga de 15 ml
7. Lavar o cálice com 5 ml de água destilada, e esta deve ser adicionada ao mesmo tubo e centrifugado a 1.120xg (n° 3 na centrifuga do laboratório de química do IAL) por 5 minutos.
8. Em seguida, descartar sobrenadante novamente, deixando ao fim 2mL da amostra.
9. Colocar sedimento final em tubo de eppendorf e congelar a -20°C até realização das análises moleculares, identificando os tubos com o nome da propriedade rural, data de coleta, data de processamento da hortaliça.

Referencia:

FRANCO, R. M. B. Controle de Qualidade: Metodologia de Detecção de Ovos de Helminhos em Hortaliças (Parte 3). Mini-Curso Teórico e Prático: Detecção de Ovos de Helminhos em Hortaliças. Laboratório de Protozoologia. Universidade Estadual de Campinas - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal Instituto de Biologia. 2016. [Internet]. [citado em de janeiro de 2019]. Disponível em: <https://www2.ib.unicamp.br/branco/parasit/spp/Mini%20curso/3%20Mini-CursoControle%20de%20Qualidade%20SPP%202016.pdf>.

ANEXO 4 - Protocolo de Coleta de Amostras da Mãos

Coleta de Amostras das Mãos

1. Selecionar 1 produtor que possua contato direto no cultivo das hortaliças, para a realização da lavagem das mãos
2. O pesquisador deve primeiramente mostrar ao participante como fazer esta lavagem das mãos, limpando unhas e dedos, junções entre os dedos, palma e dorso da mão.
3. Em seguida, o pesquisador deve segurar o saco plástico aberto embaixo das mãos do participante
4. Com as duas mãos posicionadas sobre a abertura do plástico, um auxiliar deve despejar aos poucos água destilada sobre as mãos do participante de forma que a água da lavagem caia dentro do plástico e até que se complete o volume de 200 ml.
5. Em seguida, fechar muito bem a abertura do saco plástico com fita adesiva.

Concentração das Amostras das Mãos

1. Recolha o saco plástico contendo a amostra da caixa térmica e faça um corte pequeno em umas das “pontas” inferiores do plástico
2. Em cálice de sedimentação, despejar o conteúdo da amostra e tampar a abertura do cálice com papel toalha e fita adesiva/elástico
3. Deixe a amostra em repouso no cálice por até 24 horas.
4. Após tempo de sedimentação, descartar o sobrenadante com auxílio de pipeta Pasteur, deixando cerca de 10 ml do sedimento e transferi-lo para tubo de centrifuga de 15 ml.

5. Lavar o cálice com 5 ml de água destilada, com auxílio de pipeta Pasteur e adicionar o conteúdo no mesmo tubo e centrifugar a 3.000 rpm por 5 minutos.
6. Em seguida, descartar sobrenadante novamente, deixando ao fim 2 ml.
7. Colocar sedimento final em tubo de eppendorf e congelar a -20°C até realização das análises moleculares, identificando os tubos com o nome da propriedade rural, data de coleta, data de processamento da hortaliça.

Referencia:

FRANCO, R. M. B. Controle de Qualidade: Metodologia de Detecção de Ovos de Helminhos em Hortaliças (Parte 3). Mini-Curso Teórico e Prático: Detecção de Ovos de Helminhos em Hortaliças. Laboratório de Protozoologia. Universidade Estadual de Campinas - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal Instituto de Biologia. 2016. [Internet]. [citado em de janeiro de 2019]. Disponível em: <https://www2.ib.unicamp.br/branco/parasit/spp/Mini%20curso/3%20Mini-CursoControle%20de%20Qualidade%20SPP%202016.pdf>.

ANEXO 5 – Protocolo de Coleta de Amostras Fecais

Coleta de Amostras Fecais

1. Entregar pote coletor para participante, esclarecendo suas dúvidas.
2. O participante deve adicionar uma pequena quantidade da amostra no pote
3. Armazenar o pote coletor com a amostra em geladeira por período máximo de 24 horas.

Concentração das Amostras Fecais

1. Primeiramente deve-se diluir toda a amostra de fezes recebidas (1 parte de fezes p/ quase 10 partes de água.)
2. Em copo descartável colocar a amostra, adicionar 100 ml de água destilada e homogeneizar.
3. Coar a amostra em gaze (dobrada em 4) na abertura do cálice de sedimentação
4. Deixar sedimentando por 24h em bancada
5. Com pipeta Pasteur recolher 3ml do sedimento separando:
 - 1 ml em microtubo 1,5 mL para leitura futura de microscópio óptico adicionando formol. Armazenar sob congelamento.
 - 2 ml para técnica de biologia molecular em microtubo sem formol.
6. Centrifugar os tubos de 2mL de biologia molecular por 3.000 rpm por 5 minutos (pellet fecal) e armazenar no congelador.
7. No caso de visualização em microscópio, corar as lâminas uma gota de lugol.

Referencia:

FRANCO, R. M. B. Controle de Qualidade: Metodologia de Detecção de Ovos de Helmintos em Hortaliças (Parte 3). Mini-Curso Teórico e Prático: Detecção de Ovos de Helmintos em Hortaliças. Laboratório de Protozoologia. Universidade Estadual de Campinas - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal Instituto de Biologia. 2016. [Internet]. [citado em de janeiro de 2019]. Disponível em: <https://www2.ib.unicamp.br/branco/parasit/spp/Mini%20curso/3%20Mini-CursoControle%20de%20Qualidade%20SPP%202016.pdf>.

ANEXO 6 – Protocolo de Concentração das Amostras de Água

Métodos de concentração dos organismos

1. Monte o aparelho de filtração (Millipore) ligando-o na bomba de pressão positiva e colocando a membrana de ésteres mistos de celulose (47 mm de diâmetro, 3,0 µm de porosidade) (Millipore)
2. Filtre a amostra coletada até esgota-la trocando a membrana quando necessário ou a cada 1 L da amostra filtrada.
3. A membrana deve ser retirada com o auxílio de uma pinça estéril.
4. Colocar a membrana em uma placa de Petri, estéril, adicionando um pequeno volume de água destilada para evitar o ressecamento

Métodos de eluição

1. Após a filtração oocistos e cistos presentes nas amostras são recuperados da membrana mediante extração mecânica (raspagem e lavagem da membrana).
2. Utilizando alças plásticas raspar a superfície da membrana em todas as direções, por 10 min, em um pequeno volume de água destilada (<1,0 mL). Com pipeta Pasteur, recolher o líquido e colocá-lo em um tubo cônico de centrifuga.
3. Com pequeno volume de água destilada realize outra lavagem, com pipeta Pasteur gerando um fluxo de líquido sobre a membrana, lavando toda a superfície. Recolher líquido em tubo de centrifuga.
4. Repetir passos 2 e 3 até o líquido atingir cerca de 15 ml do tubo.

Métodos de centrifugo-concentração do material resultante da eluição/extração mecânica

1. Centrifugar o material eluido nos tubos a 3.000 rpm na centrifuga durante 10 minutos.
2. Usando a pipeta Pasteur retirar o sobrenadante evitando mexer com o sedimento.
3. Adicionar 3 mL de água destilada ao tubo de centrifuga, ressuspensando o sedimento com a pipeta Pasteur.

4. Lave a pipeta em 1 mL de água destilada, adicionando esse volume ao tubo. Prossiga até o tubo alcançar um volume entre 15 mL.
5. Repetir passo 1.
6. Utilizando a pipeta Pasteur, aspire o sobrenadante até a marcação de 900 microlitos.
7. Leve o tubo ao vortex por 3 minutos e imediatamente transfira o sedimento final para um microtubo de 2 mL, adicione 100 microlitros de água destilada ao tubo de centrifuga (vazio), vortexar por mais 3 minutos e transferir este volume de 100 microlitros ao microtubo, gerando o volume final de 1 mL.
8. Ao fim, identificar a amostra presente no microtubo com etiqueta.

Referencia:

Protocolo 1: Filtração em membrana para análise da presença de protozoários patogênicos em água. Laboratório de Protozoologia, DBA. Instituto de Biologia, Unicamp – Protocolos Laboratoriais.

ANEXO 7 – Protocolo de Pesquisa de Coliformes Totais e E. coli em Água de Irrigação

- Ligar UV do fluxo por 20 min
- Identificar os frascos com uma etiqueta contendo o nome da propriedade e data de coleta
- Despejar 100 ml da amostra de água do frasco coletor para um novo frasco com tampa.
- Adicionar o indicador do kit dentro do frasco
- Homogeneizar até que o pó dissolva totalmente na amostra
- Incubar os frascos de 35° por 24 h.
- Após 24h, ler os frascos em luz UV conforme orientação do fabricante.

Referencias:

IDEXX Laboratories. **Colilert**. [Internet]. [citado 2019 Abr 30]. Disponível em <https://www.idexx.com.br/files/colilert-procedure-en.pdf>

ANEXO 8 - Protocolo de Extração de DNA

Pesquisa de *Giardia* spp. *Cryptosporidium* spp, *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* e *Taenia* spp. em amostras de água, hortaliças, lavado das mãos e fezes utilizando kit de extração QIAmp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAgen).

1. Pipetar 220µL da amostra concentrada anteriormente em tubos de 2 ml (homogeneizar antes

2. Dentro da capela adicionar no tubo de amostra 1ml de Inhibitex Buffer e vortexar por 1 minuto até completa homogeneização

Obs: o tampão inhibitex pode precipitar, é importante aquece-lo e homogeneizá-lo.

3. Aquecer a suspensão por 5 minutos a 95°C. Vortexar por 15 segundos

Obs: Para melhor ruptura dos cistos e oocistos pode ser feito ruptura mecânica por choque térmico com nitrogênio líquido, congelando e descongelando a 95°C por 5 min em banho seco (repetir 5 vezes).

4. Centrifugar por 2 min (14.000 rpm)

5. Em novo tubo de 1,5 ml, pipetar 25µl de Proteinase K e acrescentar 600µl do sobrenadante.

6. Acrescentar 600 µl do tampão AL, no mesmo tubo e vortexar por 15 seg.

Obs: Não adicionar a proteinase K diretamente no tampão AL. Amostra e o tampão AL devem estar misturados para formar uma solução homogênea.

7. Incubar a 70°C sob agitação em overnight.

8. Adicionar, no mesmo tubo, 600 µl de etanol (96% - 100%) e vortexar.

9. Transferir 600 µl da suspensão para a coluna e centrifugar por 1 min (14.000 rpm). Transferir a coluna para um novo tubo 2 ml (kit) e adicionar mais 600 µl da suspensão e centrifugar por 1 min (14.000 rpm). Repetir até esgotar a amostra.

10. Adicionar a coluna 500 µl do tampão de lavagem AW1 e centrifugar por 1 min (14.000 rpm). Descartar tubo de 2ml (kit) com o filtrado e substituí-lo por outro limpo.

11. Adicionar a coluna 500 µl do tampão de lavagem AW2 e centrifugar por 3 min (14.000 rpm). Descartar o tubo de 2 ml (kit) com o filtrado e substituí-lo por outro tubo de 1,5 ml (não fornecido do kit).

12. Centrifugar a coluna por mais de 3 min (14.000 rpm) para retirar o excesso do tampão AW2.

13. Transferir a coluna para um novo tubo de 1,5 ml e adicionar 200 µl do tampão de eluição ATE. Incubar por 1min em t° ambiente e centrifugar por 1 min (14.000 rpm). Retirar a coluna e guardar o DNA (conteúdo centrifugado) em geladeira (4°C a 20°C) por 24h.

Referencia:

QIAGEN. QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit. Quick-Start Protocol. 2017.

ANEXO 9 – Protocolo de Purificação

Protocolo utilizado para purificação das amostras para sequenciamento genético de acordo com as orientações do Kit GF xTM PCR-DNA and Gel Band Purification.

- Pesar o microtubo de 1,5mL vazio e anotar.
- Com o auxílio de um bisturi estéril, recortar a banda do gel.
- Inserir a banda do gel e realizar nova pesagem.
- Subtrair os valores de peso antes da colocação do gel (microtubo vazio) e após colocação do gel (microtubo cheio).
- Para cada 10mg de gel, adicionou-se 10µL de tampão de captura (Tipo 2) para a desnaturação e solubilização.
- Homogeneizar em agitador por 1 minuto e por inversão durante 15 segundos. Esse passo foi repetido três vezes.
- Inserir a coluna dentro do tubo coletor e incubar durante 10 minutos à 60°C em banho seco para dissolver a agarose.
- Centrifugar à 8.000 rpm por 30 segundos.
- Transferir todo o conteúdo (tampão de captura acrescido da amostra) para a coluna juntamente ao tubo coletor e incubar à temperatura ambiente por 1 minuto.
- Em seguida, centrifugar à 12.000 rpm durante 30 segundos.
- Descartar o líquido do tubo coletor e retornar a coluna para dentro dele.
- Adicionar 500µL de tampão de lavagem (Tipo 1) à coluna que estava dentro do tubo coletor.
- Centrifugar à 12.000 rpm por 30 segundos.
- Descartar o tubo coletor juntamente com o líquido que estava em seu interior e transferir a coluna para um microtubo de 1,5mL.
- Adicionar 50µL de Tampão de Eluição (Tipo 6) e incubar à temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Em seguida, centrifugar à 12.000 rpm durante 1 minuto para recuperação do DNA purificado.
- Estocar em freezer à -20 °C.

Referencia:

GE Healthcare. ilustra GF xTM PCR-DNA and Gel Band Purification. Protocol. 2017