



DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE *Giardia duodenalis* EM HORTALIÇAS CULTIVADAS NA MESORREGIÃO NORTE CENTRAL DO PARANÁ

Liara Izabela Lopes Romera (PIC/Uem), Renata Coltro Bezagio (Mestranda/PCS/UEM), Carla Zangari de Souza (Mestre/PCS/UEM), Mônica Lúcia Gomes (Co-orientadora), Cristiane Maria Colli (Orientadora), e-mail: criscolli@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Básicas da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas / Parasitologia / Protozoologia Parasitária Humana

Palavras-chave: *Giardia duodenalis*, Hortaliças, PCR-RFLP.

Resumo:

O objetivo desse trabalho foi investigar *Giardia duodenalis* e suas *assemblages* em hortaliças cultivadas em municípios da Mesorregião Norte Central do Paraná. Foram analisadas 80 amostras de hortaliças, sendo 68 coletadas de produtores que comercializavam as verduras na "Feira do Produtor" de Maringá e 12 amostras do único produtor do município de Ângulo. As amostras foram coletadas em sacos novos e 50 g da porção mais externa de cada amostra foram lavados com 100 mL de Tween 80 a 1% por 1 minuto, seguido de filtração em membrana de acetato de celulose. Todo material retido foi extraído mecanicamente com espátula plástica. O líquido resultante foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado resultando em um sedimento de 0,5 mL, do qual foi extraído o DNA com o Kit comercial "PureLink PCR Purification®". O fragmento de aproximadamente 432 pares de base do gene Glutamato-Desidrogenase foi amplificado numa reação de seminested-PCR. A genotipagem foi realizada pela técnica de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP) com a utilização da enzima de restrição *Nla* IV. Das 80 hortaliças analisadas, 13/80 (16,25%) apresentaram PCR positiva, sendo 3/12 amostras de Ângulo e 10/68 de Maringá. A genotipagem por PCR-RFLP foi possível em quatro amostras de Maringá, que apresentaram as "assemblages" AII (3/4 – 75%) e AI (1/4 – 15%). Nesse estudo encontrou-se uma elevada frequência de *G. duodenalis* nas hortaliças consumidas cruas, e "assemblages" que podem infectar humanos, indicando que as hortaliças podem ser possíveis fontes de infecção.



Introdução

O consumo de verduras cruas, contaminadas e lavadas inadequadamente, tem constituído um importante meio de transmissão de várias doenças infecciosas e parasitárias, devido a frequente prática de irrigação de hortas com água contaminada por material fecal ou mesmo adubadas com dejetos humanos e/ou animais (COLLI et al., 2015). Por isso, a investigação de possíveis parasitos que possam estar presentes em hortaliças é de suma importância, pois servem como meios de prevenção, fazendo com que haja interrupção do ciclo de transmissão destes.

Causador da giardíase, *Giardia duodenalis* (sinônimos: *G. lamblia* e *G. intestinalis*) é o protozoário mais comumente encontrado no intestino delgado do homem e outros animais domésticos e selvagens (FENG e XIAO, 2011; COLLI et al., 2015). Este parasito apresenta duas formas evolutivas: o cisto que é infectante e resistente ao meio ambiente e o trofozoíto que coloniza o epitélio intestinal causando a doença, que vai de assintomáticas à diarreias crônicas com má absorção. A contaminação ocorre basicamente pela ingestão acidental de cistos em água ou alimentos contaminados (FENG e XIAO, 2011). O importante papel desse protozoário em vários surtos epidêmicos de veiculação hídrica e alimentar coloca em evidência as hortaliças que, por serem ingeridas cruas, favorecem a aquisição da giardíase (SILVA et al., 2005).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a técnica de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP), foi possível detectar diferenças genéticas entre cepas de *Giardia* morfologicamente idênticas (FENG e XIAO, 2011). Como consequência, um grande número de espécies e genótipos de *Giardia* são agora reconhecidos, e diferem principalmente em seu hospedeiro. Isolados de *G. duodenalis* são classificados em 8 “assemblages”, que são morfologicamente idênticas, porém, geneticamente distintas (FENG e XIAO, 2011). As “assemblages” A e B de *G. duodenalis* afetam uma ampla gama de hospedeiros, incluindo os seres humanos. O gene codificador da glutamato desidrogenase (GDH), têm sido muito utilizado para caracterização molecular deste protozoário, permitindo identificar diferentes “assemblages” desta espécie (COLLI et al., 2015).

O objetivo desse trabalho foi investigar *G. duodenalis* e suas “assemblages” em hortaliças cultivadas em municípios da Mesorregião Norte Central do Paraná.



Materiais e métodos

1. *Área de estudo:* A mesorregião Norte Central Paranaense está localizada, em sua maior porção, no Terceiro Planalto Paranaense. Essa região é constituída por 79 municípios, dos quais Ângulo (23°11'41"S, 51°54'55"W) e Maringá (23°25'31"S, 51°56'19"W) (IPARDES) foram investigados.

2. *Coleta das amostras:* As hortaliças cultivadas em contato direto com o solo foram obtidas de produtores que comercializavam as verduras na "Feira do Produtor" de Maringá e do único produtor do município de Ângulo. Foram coletadas em sacos plásticos novos e encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Ambiental e de Alimentos da UEM, para serem analisadas.

3. *Processamento das amostras e extração do DNA:* 50g da porção mais externa de cada amostra foram lavados com 100 mL de solução de Tween 80 a 1% mediante agitação mecânica por 1 minuto, seguido de filtração em membrana de acetato de celulose. Todo material retido foi extraído mecanicamente, duas vezes, com espátula plástica com auxílio de solução de Tween 80 a 0,1%. O líquido resultante foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos (NISHI et al., 2009). O sobrenadante foi descartado resultando em um sedimento de 0,5 mL, do qual, 100 µL foram utilizados para extração do DNA, com a utilização do Kit comercial "PureLink PCR Purification®", conforme recomendações do fabricante.

4. *Análises moleculares:* O fragmento de aproximadamente 432 pares de base do gene GDH foi amplificado em reação de seminested-PCR. Os iniciadores utilizados foram: GDHeF (1ª reação), GDHiF (2ª reação) e GDHiR (1ª e 2ª reações). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida e revelados com sais de prata. A genotipagem de *G. duodenalis* foi realizada por PCR-RFLP, com a utilização da enzima *Nla* IV para digestão dos produtos amplificados (COLLI et al., 2015). Os perfis obtidos para as amostras isoladas de hortaliças foram comparados com amostras referencias de diferentes genótipos de *G. duodenalis* e também entre si para verificar se existe ou não relação entre eles.

Resultados e Discussão

Foram coletadas 80 amostras de hortaliças, que são consumidas cruas, sendo 68 da cidade de Maringá e 12 da cidade de Ângulo, das quais 18 eram pés de rúcula, 18 maços de almeirão, 32 pés de alface, 6 maços de salsa e 6 pés de chicória.

Das amostras de hortaliças analisadas, 13 (16,2%) apresentaram PCR positiva, sendo estas: 5/32 (15,6%) de alface, 2/18 (11,1%) de rúcula, 3/18 (16,7%) de almeirão, 2/6 (33,3%) de salsa e 1/6 (16,7%) de chicória. Três



amostras positivas são de Ângulo e 10 de Maringá. A contaminação de hortaliças por cistos de *G. duodenalis* pode ocorrer por exemplo durante o processo de irrigação com água contaminada ou pelo contato direto com o solo. A genotipagem por PCR-RFLP foi possível em quatro amostras de Maringá, que apresentaram as assemblages AII (3/4 – 75%) e AI (1/4 – 15%). Essas duas assemblages podem infectar humanos e outros mamíferos (FENG e XIAO, 2011), indicando que as hortaliças podem ser possíveis fontes de infecção de *G. duodenalis*. Nas demais amostras positivas pela PCR, a genotipagem não foi possível provavelmente pela baixa quantidade de material genético do parasito.

Conclusões

Nesse estudo encontrou-se uma elevada frequência de *G. duodenalis* nas hortaliças consumidas cruas, nos municípios investigados. Indicando a necessidade de melhorias nas condições de cultivo, bem como medidas de educação em saúde aplicadas aos produtores de hortaliças.

Referências

COLLI, C.M.; BEZAGIO, R.C.; NISHI, L.; BIGNOTTO, T.S.; FERREIRA, E.C.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L.; GOMES, M.L. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in southern Brazil indicates a relationship among them. **PLoS ONE** v. 10, n.3, p. e0118065, 2015.

FENG, Y; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.1, p. 110-140, 2011.

IPARDES 2015. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. Disponível em: <<http://www.ipardes.gov.br>> acesso em 15 fev. 2015.

NISHI L.; BAESSO, M.L.; SANTANA, R.G.; FREGADOLLI, P.; FALAVIGNA, D.L.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system. **Zoonoses Public Health**, v. 56, p. 221-228, 2009.

SILVA, C. G. M.; ANDRADE, S. A. C.; STAMFORD, T. L. M. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e outros parasitas em hortaliças consumidas in natura, no Recife. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.10, p. 63-69, 2005.