INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E GENOTÍPICA DE *Giardia spp.* EM HORTALIÇAS UTILIZADAS PARA O CONSUMO DA POPULAÇÃO EM LOCAIS DE PRODUÇÃO

Fernanda Ferreira Evangelista (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Katyelle Rafael (Mestranda/UEM), Ana Lúcia Falaviga Guilherme (Orientador),
e-mail: alfalavignauem@gmail.com

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

Ciências Biológicas / Parasitologia / Protozoologia Parasitária Humana

Palavras-chave: *Giardia duodenalis,* hortaliças, diagnóstico molecular.

Resumo:
Giardia spp é um parasita gastrintestinal que afeta uma grande variedade de animais domésticos e silvestres, inclusive o homem, sendo responsável por quadros de diarreia normalmente de caráter auto-limitante, podendo ocorrer tanto em regiões tropicais como temperadas. Amostras de hortaliças *in natura* utilizadas para o consumo da população, em locais de produção no noroeste do Paraná foram analisadas e realizadas as extrações e purificações do DNA para investigação molecular e genotípica (GDH) de cisto de *Giardia spp*. Assim, foi possível a análise de 136 amostras de hortaliças, sendo 8,1% contaminadas por *Giardia spp.*

Introdução

O determinado estudo remete a pesquisa de *Giardia spp* em hortaliças *in natura*, de consumo da população de uma cidade do noroeste do Paraná.
Giardia spp. é um parasito gastrintestinal que afeta o homem e vários animais, sendo eles domésticos ou silvestres. Os sintomas dessa infecção são quadros de diarreia, dor abdominal, má absorção, e até mesmo assintomática, impactando no crescimento e no desenvolvimento intelectual de crianças (ELIGIO-GARCÍA *et al*., 2008) podendo ocorrer tanto em regiões tropicais como temperadas (THOMPSON *et al*, 2009).
O consumo de hortaliças *in natura* constitui parte de uma dieta balanceada e saudável, em razão dos valores nutricionais, baixas calorias e custo acessível, em qualquer faixa etária da população. A OMS reconhece que o consumo diário de 400 g de frutas e verduras pode diminuir a incidência de doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer (CAMPOS *et al.,* 2010).

Apesar dos benefícios, as hortaliças, quando contaminadas, podem atuar como fontes de transmissão de enteroparasitos, vindo a acarretar danos à saúde humana. A contaminação destes vegetais pode ocorrer por meio de água contaminada por material fecal, utilizada na irrigação e lavagem, solos contaminados por adubos orgânicos (DANCHAIVIJITR *et al*., 2005).

Embora tenham sido descritas uma variedade de parasitas que podem ser adquiridos por consumo de hortaliças contaminadas, o mais comum é a *Giardia.* Atualmente com base na morfologia das formas parasitárias são reconhecidas seis espécies: os genótipos A e B acometem um grande número de hospedeiros, incluindo os seres humanos. Há vários trabalhos que relataram o papel zoonótico destes dois genótipos e a importância dos animais domésticos em determinadas comunidades (ELIGIO-GARCÍA *et al*., 2009). Já, os genótipos C e D estão presentes em cães; enquanto que os genótipos E, F e G são encontrados em gado, gatos e em roedores, respectivamente (THOMPSON *et al*., 2009).

A região Noroeste do Paraná, campo desta pesquisa, apresenta inúmeras propriedades utilizadas para plantações de hortaliças para consumo, cuja população tem o hábito irrigá-las com água de fontes alternativas. Outro destino dessas hortaliças são supermercados, feiras livres e CEASAs da região. Com base nessas informações, o estudo teve por objetivo efetuar o diagnóstico molecular de cistos de *Giardia* spp. em hortaliças utilizadas para o consumo da população, em locais de produção, noroeste do Paraná, Brasil.

Materiais e métodos

Amostras de hortaliças: As amostras foram obtidas em locais de produção de hortaliças a serem consumidas cruas pertencentes à 15ª Regional de Saúde do Paraná (RS/PR), acondicionadas em sacos plásticos de primeiro uso em temperatura ambiente, e transportadas para o Laboratório de Parasitologia da Universidade Estadual de Maringá, e serão processadas logo em seguida.

Recuperação de cistos de Giardia spp. das amostras coletadas: Para analise dos vegetais, cada amostra (50g) preferencialmente as folhas externas, foi lavada com solução de Tween 80 a 1%, mediante agitação manual por um minuto. O líquido resultante foi processado após lavagem e filtrado em membrana de éster de celulose, 47 mm de diâmetro e 0,3 µm de porosidade (Millipore®), com auxílio de uma bomba a vácuo pressão negativa entre 10 e 15 mmHg. Em seguida, raspou-se a membrana mecanicamente e o material obtido foi concentrado por centrifugação, desprezou-se o sobrenadante até o volume final de 1 mL.

Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):: A extração do DNA foi feita com a utilização do Kit comercial PureLink PCR Purification®, conforme as recomendações do fabricante. O fragmento de aproximadamente 432pb do gene de Glutamato Desidrogenase (GDH) foi amplificado em reação de seminested PCR (Read et al., 2004). Os iniciadores utilizados foram: GDHeF: TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT, GDHiF: CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG e GDHiR: GTT RTC CTT GCA CAT CTC C. A mistura de cada reação de amplificação foi realizada em um volume de 11µL, contendo tampão 10X (200mM Tris-HCL pH 8,4, 500mM KCL), 1,5mM de MgCl2, 0,5U de Taq DNA polimerase Platinum cada iniciador (GDHeF e GDHiR na primeira reação e GDHiF e GDHiR na segunda reação), H20 Mili-Q estéril e 2µL de DNA total. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos: 94°C por 45 s, 55°C 30s, 72°C por 45s, 72°C por 5 minutos, na primeira e na segunda reação. Os produtos amplificados de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% revelado com prata.

Resultados e Discussão

A contaminação de hortaliças por *Giardia spp.* pode ser transmitida através da água contaminada por material fecal, utilizada na irrigação e lavagem, solos contaminados por adubos orgânicos, manipulação e transportes inadequados, ou veiculação mecânica de insetos. Foram obtidas 136 amostras das hortas comunitárias da 15ª RS/PR, sendo 6 (4,41%) de alface lisa, 15 (11,02%) de alface mimosa, 43 (31,61%) de alface crespa, 7 (5,14%) de couve, 48 (35,29%) de almeirão, 6 (4,41%) de alface roxa, 3 (2,20%) de alface americana, 4 (2,94%) de rúcula, 3 (2,20%) de escarola, 1 (0,73%) de salsinha. Após as análises laboratoriais detectou-se 11 (8,1%) amostras contaminadas com *Giardia spp.*

Na coleta das hortaliças percebeu-se a presença de animais no local, como cães e gatos. Estudos revelam que animais podem ser meios de disseminação e transmissão de parasitas (DANCHAIVIJITR, 2005). Assim, Alves (2002) afirma que hortaliças consumidas cruas em forma de saladas podem servir como via de transmissão de espécies de helmintos, protozoários, bactérias e vírus, causando danos ao organismo humano.

Outro meio de disseminação é o transporte e a manipulação nos pontos de venda que podem acarretar a contaminação por microrganismos. Sendo assim, para que a contaminação seja evitada, é necessária uma conscientização do manipulador e consumidor sobre as normas de higiene. No caso das hortaliças devem ser lavadas adequadamente. Isto é importante, pois as colheitas às vezes são inundadas pela água da chuva que podem disseminar os dejetos humanos ou animais.

Conclusões

O número de hortaliças contaminadas foi baixo comparando com a quantidade coletada, mas isso não exclui a possibilidade de existirem parasitas, principalmente de *Giardia spp*. Por isso é importante a higienização das mãos e a lavagem adequada antes de serem consumidas. Todavia, parasitas em hortaliças de consumo da população é considerado um problema de saúde, o qual deve ser sessado

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Maringá e equipe de trabalho, pela infraestrutura disponibilizada para pesquisa, aos profissionais das UBSs e à Fundação Araucária, pelo investimento e por acreditar na importância da pesquisa científica.

Referências

Alves, E. G. L. Parasitos intestinais em hortaliças comercializadas em Lavras – MG. Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2002.

Campos VC. Fatores associados ao consumo adequado de frutas, legumes e verduras em adultos de Florianópolis. Rev. bras. epidemiol São Paulo. p13:24-26, 2010.

Carvalho-Costa, F. A; et al. Detection of *Cryptosporidiu*m spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. p. 40:346-348, 2007.

Danchaivijitr S, et al. Prevalence and effectiveness of an education program on intestinal pathogens in food handlers. J Med Assoc Thailand, Bankok - 88:31-35, 2005.

Eligio-García L; et al. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using b-giardin restriction gene. Vet Parasitol. p.156: 205–209, 2008.

Falavigna D.L.M, et al. Análise parasitológica das hortaliças comercializadas na Central de Abastecimento do município de Maringá, Paraná, Brasil. Rev. Salusvita; 25:43-51, 2006.

Thompson, R.C, et al. The molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in coyotes from Alberta, Canada, and observations on some cohabiting parasites. Vet Parasitol 159:167-170. 2009.