PESQUISA DE OOCISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM HORTALIÇAS COMERCIALIZADAS EM FEIRAS LIVRES DE MARINGÁ-PR

Bruna Tiaki Tiyo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ariella Andrade Marchioro (Doutoranda/PCS/UEM), Ana Lúcia Falavigna-Guilherme (Orientador), e-mail: alfguilherme@uem.br

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

Ciências Biológicas / Parasitologia / Protozoologia Parasitária Humana

Palavras-chave: Hortifruticulturas, Diagnóstico laboratorial, Toxoplasmose.

Resumo:

O objetivo do trabalho foi pesquisar oocistos de *Toxoplasma gondii* em hortaliças comercializadas em feiras livres no município de Maringá-PR. Foram coletadas em 10/43 feiras livres (23,3%), aleatoriamente, amostras de alface-lisa, alface-crespa, almeirão, rúcula e escarola. Posteriormente, foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Ambiental e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá. Foi retirado 50g de cada amostra para ser lavado com 100mL de Tween 80 a 1% sob agitação manual por um minuto, em sacos plásticos. A solução resultante da lavagem foi filtrada a vácuo com auxílio de membrana de acetato de celulose (1,2µm de porosidade/47mm de diâmetro) e bomba a vácuo. A membrana foi raspada mecanicamente e o material obtido foi concentrado por centrifugação até volume de 1mL. Após técnica de rompimento de membrana (congelamento-descongelamento), as amostras foram extraídas pelo kit AxyPrep™Blood Genomic DNA. Para amplificação do DNA utilizou-se o iniciador B1 (B22/B23), 115pb, reveladas em gel de poliacrilamida 4,5% e coloração com prata. Das 77 amostras investigadas, observou-se a presença de DNA de *T. gondii* em duas (2,6%), uma de almeirão (3%) e outra de rúcula (50%). Trata-se de um achado inédito na América do Sul e um dos poucos observados mundialmente. A utilização da técnica de filtração a vácuo para concentrar formas parasitárias mostrou ser procedimento importante no diagnóstico do protozoário, seguido por processo físico. Utilizar uma técnica de custo relativo e fácil manuseio, como a realizada neste trabalho, pode ser introduzida em ações de vigilância sanitária, contribuindo no controle desta zoonose em amostras de hortifruticulturas.

Introdução:

Toxoplasma gondii é provavelmente o protozoário mais difundido entre a população humana e animal, incluindo aves. Esta zoonose acomete um terço da população mundial, sendo adquirida de diferentes maneiras e com infecções normalmente assintomáticas (Jones & Dubey, 2010). Estima-se que, no Brasil, a soroprevalência desta enfermidade na população humana adulta esteja entre 50 e 83%. A transmissão pode se dar pela ingestão de oocistos presentes em água, frutas e verduras, pela ingestão de cistos presentes em produtos de origem animal, como, carnes, vísceras, e por taquizoítas via transmissão congênita (Jones & Dubey, 2010). A rota oral de infecção por *T. gondii* parece ser a mais importante para a espécie humana, como a ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos excretados nas fezes de felídeos infectados. Os oocistos são estruturas envolvidas por uma parede extremamente resistente, que protege o parasita contra danos provocados por agentes físicos e químicos, podendo permanecer viáveis no solo e na água por períodos superiores a um ano, principalmente em regiões tropicais, que são quentes e úmidas (Gomez-Marin *et al*., 2011). Por outro lado, a utilização 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 (Lass *et al*, 2012). Apesar dos benefícios, as hortaliças, quando contaminadas, podem atuar como fontes de transmissão, principalmente de enteroparasitos, vindo a acarretar danos à saúde humana (Jones & Dubey, 2010). A contaminação destes vegetais pode ocorrer através da água contaminada por material fecal, utilizada na irrigação e lavagem, solos contaminados por adubos orgânicos (Jones & Dubey, 2010).

Materiais e métodos:

*Amostras de hortaliças.*Foram coletadas, aleatoriamente, amostras de alface lisa e crespa (*Lactuca spp.*), almeirão (*Cichorium intybus*), rúcula (*Eruca sativa*) e escarola (*Cichorium endivia*) em 10/43 feiras livres (23,3%) da zona urbana do município de Maringá-PR. As feiras foram selecionadas por sorteio no período de agosto/2015 a maio/2016.
Processamento das amostras. Cada amostra foi acondicionada em saco plástico de primeiro uso, e transportada para o Laboratório de Parasitologia Ambiental e de Alimentos/UEM e processada em seguida. De cada amostra foram lavados 50g com 100 mL de Tween 80 a 1%, sob agitação manual por um minuto. O líquido resultante foi filtrado em membrana de éster de celulose, 47mm de diâmetro e 0,3µm de porosidade (Millipore®), com auxílio

de uma bomba a vácuo. Em seguida, a membrana foi raspada mecanicamente e o material concentrado por centrifugação, desprezando o sobrenadante até o volume de 1 mL. Para ruptura do oocisto de *T. gondii*, foram retirados 300µL para ser submetido ao processo de congelamento em nitrogênio líquido (-196ºC) por 5min, seguido por descongelamento em banho seco a 65ºC por 5min. Este ciclo foi repetido por cinco vezes.

Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A extração foi realizada com o Kit comercial AxyPrep™ Blood Genomic DNA (Axygen Biosciences), observando as recomendações do fabricante. Após a extração as amostras foram submetidas à PCR com o marcador molecular B1 (B22-B23), amplificando uma sequência de 115pb. Os produtos amplificados foram visualizados em géis de poliacrilamida 4,5%, revelados pela prata.

Resultados e Discussão:

Foram investigadas 77 amostras de hortaliças: 34 de alface lisa, 33 de alface crespa, seis de almeirão, duas de rúcula e duas de escarola. Em duas amostras (2,6%) foi observada a presença de DNA de *T. gondii*, uma de almeirão (3%) e outra de rúcula (50%). Trata-se de um achado inédito na América do Sul, e um dos poucos observados em termos mundiais (Lass *et al*; Lalonde *et al*, 2016). Apesar da elevada dispersão deste protozoário, no meio ambiente, há raros registros de pesquisas em hortaliças consumidas cruas, provavelmente pelas dificuldades técnicas. Lass *et al*, 2012, na Polônia, Europa, fizeram o primeiro relato da presença de DNA de *T. gondii* e encontraram 21/216 (10%) amostras positivas dentre os vegetais, rabanete, cenoura e alface. Todavia, estes autores utilizaram técnicas de custos muito mais elevados, como a PCR em tempo real e um laborioso processo de filtração. Mesmo assim, os autores relataram elevada perda de oocistos durante o processo de filtração. Lalonde *et al*, 2016, no Canadá, pesquisou a presença de coccídeos utilizando a qPCR, e observou três (0,26%) amostras de espinafre positivas, de um total de 1171 amostras de hortaliças testadas. Já, no presente trabalho, as técnicas utilizadas foram de menor custo, como a PCR tradicional e filtração em membrana. Previamente foi possível observar, em trabalho experimental, no Laboratório de Parasitologia/DBS/UEM, que este processo utilizado detectou DNA de *T. gondii* em baixas concentrações de oocistos. Todavia, cabe lembrar que há substâncias interferentes que podem bloquear a extração do DNA, como os extratos fenólicos e ácido húmico, presentes no solo e nos vegetais.

A utilização da técnica de filtração a vácuo mostrou ser procedimento importante no diagnóstico do *T. gondii*, seguido por processo físico. Cabe lembrar a importância de buscar o aprimoramento de técnicas laboratoriais

para esta zoonose, pois as infecções por ingestão de oocistos podem ser consideradas comuns (Gotteland *et al*, 2014) e mais severas do que a ingestão de cistos teciduais (Jones & Dubey, 2010). Considerando o elevado consumo e a importância das hortifruticulturas em uma dieta balanceada, a utilização de uma técnica de custo relativo, prática e de fácil manuseio, como a realizada neste trabalho, pode ser introduzida em serviços voltados à ações de vigilância sanitária, contribuindo no controle desta zoonose em amostras de hortifruticulturas.

Conclusões:

Pela escassez de dados na literatura, nossos resultados apontam alternativa em subsidiar medidas de vigilância sanitária e epidemiológica, em todos os elos da cadeia de produção e de distribuição de hortifruticulturas.

Agradecimentos:
Ao PIBIC/CNPq/FA/UEM.

Referências:

Gotteland C, Gilot-Fromont E, Aubert D, Poulle ML, Dupuis E, Dardé ML, Forin-Wiart MA, Rabilloud M, Riche B, Villena I. Spatial distribution of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil in a rural area: Influence of cats and land use. **Veterinary Parasitology**. v. 205, p. 629-37, 2014.

Gomez-Marin JE, De-La-Torre A, Angel-Muller E, *et al*. First colombian multicentric newborn screening for congenital toxoplasmosis. **PLos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, e1195, 2011.

Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis-recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 10-25, 2010.

Lass A, Pietkiewicz H, Szostakowska B, Myjak P. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 1101-08, 2012.

Lalonde LF, Gajadhar AA. Optimization and validation of methods for isolation and real-time PCR identification of protozoan oocysts on leafy green vegetables and berry fruits**. Food and Waterborne Parasitology**, v. 2, p. 1-7, 2016.