

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROBERTA DE LIMA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PARASITOLÓGICA DA ÁGUA
DE IRRIGAÇÃO, HORTALIÇAS ORGÂNICAS E MINIMAMENTE PROCESSADAS
DESTINADAS AO CONSUMO HUMANO EM CURITIBA, PARANÁ.

CURITIBA

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROBERTA DE LIMA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PARASITOLÓGICA DA ÁGUA
DE IRRIGAÇÃO, HORTALIÇAS ORGÂNICAS E MINIMAMENTE PROCESSADAS
DESTINADAS AO CONSUMO HUMANO EM CURITIBA, PARANÁ.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em Parasitologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal.

Coorientador: Dr. Nilson Branco.

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Lima, Roberta de.

Avaliação da qualidade microbiológica e parasitológica da água de irrigação, hortaliças orgânicas e minimamente processadas destinadas ao consumo humano em Curitiba, Paraná. / Roberta de Lima. – Curitiba, 2021.
141 f. : il.

Orientador: Diego Averaldo Guiguet Leal.
Coorientador: Nilson Branco.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Água de irrigação. 2. Cryptosporidium. 3. Giardia. 4. Helminto. 5. Hortaliças. 6. Alimentos – Contaminação. 7. Alimentos – Microbiologia – Análise. 8. Agricultura orgânica. 9. Água – Microbiologia. I. Título. II. Leal, Diego Averaldo Guiguet. III. Branco, Nilson. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20.ed.) 576.163



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ROBERTA DE LIMA** intitulada: **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PARASITOLÓGICA DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO, HORTALIÇAS ORGÂNICAS E MINIMAMENTE PROCESSADAS DESTINADAS AO CONSUMO HUMANO EM CURITIBA, PARANÁ**, sob orientação do Prof. Dr. DIEGO AVERALDO GUIGUET LEAL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Outubro de 2021.

Assinatura Eletrônica

28/10/2021 16:49:05.0

DIEGO AVERALDO GUIGUET LEAL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

28/10/2021 17:22:01.0

SILMARA MARQUES ALLEGRETTI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS)

Assinatura Eletrônica

29/10/2021 10:41:01.0

ELAINE CRISTINA DE MATTOS

Avaliador Externo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1695 - E-mail: posmpp@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 122876

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 122876

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir realizar este sonho.

Ao meu namorado Roger, o maior incentivador para que eu pudesse estar aqui.

Às amigas que vou levar para toda vida, Amanda, Barbara, Cristiane, Juliana, Máira e Patricia. Vocês são o maior presente que levo da pós-graduação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal por toda sua dedicação e contribuição para meu desenvolvimento acadêmico e profissional neste caminho que percorremos juntos desde a graduação.

Ao meu coorientador Dr. Nilson Branco pelo auxílio, acolhimento e por me proporcionar excelente ambiente de aprendizagem junto à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) nos momentos em que passei pela instituição e ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Andrey Andrade por ser uma grande inspiração profissional e por seu imprescindível auxílio para o pleno desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. RONALDA SILVA ARAÚJO por sua enorme contribuição e por partilhar de seu conhecimento para que este estudo fosse concluído com sucesso.

Ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN) - Unidade de Fronteira, Foz do Iguaçu, e especialmente ao Gustavo Strieder pela parceria desde o início do projeto para realização das análises.

Ao Laboratório de Parasitologia Molecular pelo acolhimento ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Agradecimento especial à Universidade Federal do Paraná, funcionários e todo corpo docente por me proporcionarem formação sólida para as ciências e exercício profissional desde a graduação.

RESUMO

A produção de alimentos orgânicos está associada a um modelo de desenvolvimento sustentável. As doenças transmitidas por alimentos (DTA) representam um importante problema de saúde pública. Observa-se escassez de dados acerca da contaminação por parasitos em hortaliças provenientes de cultivo orgânico e, são ainda mais escassos dados acerca da contaminação e caracterização molecular de protozoários patogênicos em vegetais prontos para o consumo. O principal objetivo desse estudo foi realizar o monitoramento da contaminação por helmintos, protozoários patogênicos e bactérias indicadoras de contaminação fecal (BICF) em diferentes etapas da cadeia produtiva de hortaliças orgânicas e, em vegetais minimamente processados em Curitiba/PR. Três grupos foram eleitos para a análise de patógenos e BICF: Grupo I – água de irrigação de hortaliças cultivadas em Rio Branco do Sul/PR, em três diferentes pontos amostrais e, em água de lavagem dos vegetais (ALV) (*Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., helmintos, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp.), Grupo II - alfaces de feiras-livres de orgânicos da capital, oriundas da mesma região produtora (helmintos e outros protozoários intestinais) e, Grupo III - hortaliças minimamente processadas de dois produtores analisadas em forma de pool (n=10 amostras/pool) (protozoários, helmintos e BICF). O isolamento de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em amostras hídricas foi realizado pela técnica de filtração em membranas seguido de Reação de Imunofluorescência Direta (RID) e, BICF pelo método de substrato cromogênico - Colilert® e Enterolert®. A contaminação por parasitos em hortaliças de feiras livres e prontas para o consumo foi realizada através da lavagem das folhas com glicina (1M), seguida de centrifugação para obtenção de sedimentos, sendo estes analisados por microscopia óptica e RID, respectivamente. Em adição, para o Grupo III a contaminação por *Giardia duodenalis* também foi aferida mediante amplificação de quatro marcadores moleculares por Nested-PCR. A contaminação por pelo menos um dos protozoários foi identificada em 40% das amostras de ALV, assim como a presença de cistos de *Balantioides coli*, em igual proporção. BICF foram detectadas em todas as amostras do Grupo I, sendo as maiores concentrações de contaminação evidenciadas para *Enterococcus* sp. Para o Grupo II, 16,3% das amostras apresentaram contaminação por parasitos, sendo a maior prevalência detectada para cistos de *Balantioides coli*, seguida da contaminação por ovos da família *Ancylostomatidae*, *Ascaris* spp., *Trichuris* sp., e *Hymenolepis nana* em igual proporção. A contaminação por *Giardia* foi evidenciada em 25% dos pool de amostras do Grupo III de ambos os produtores, por técnicas imunológicas ou moleculares, sendo as maiores taxas de contaminação evidenciadas para o produtor I. *Giardia duodenalis* foi identificada em ambos os produtores de hortaliças prontas para o consumo e o grupo genético B, identificado em dois pool de amostras do produtor I. Este é o primeiro relato da contaminação por *G. duodenalis* pertencente a um grupo genético com potencial infectante para seres humanos em hortaliças prontas para o consumo no Brasil. Reitera-se a relevância do monitoramento de diferentes pontos críticos da cadeia produtiva, visando a minimização da ocorrência de DTA e seus impactos em saúde pública.

Palavras-Chaves: Água para Irrigação; Caracterização Molecular; *Cryptosporidium*; *Giardia duodenalis*; Helmintos; Hortaliças Minimamente Processadas; Vegetais Orgânicos.

ABSTRACT

The production of organic food is associated with a sustainable development model. Foodborne diseases represent an important public health problem. There is a lack of contamination data of parasites in vegetables from organic cultivation, and data concerning the contamination and molecular characterization of pathogenic protozoa in Ready-to-Eat (RTE) salads, are even scarcer or inexistent. The main goal of the present study was to perform the monitoring of helminths, pathogenic protozoa, and fecal indicator bacteria (FIB) in different stages related with the food chain of organic vegetables, and in RTE salads in Curitiba/PR. For this, three groups were elected for the analysis of pathogens and FIB: Group I – irrigation water of vegetables from organic farming in the city of Rio Branco do Sul/PR, from three different sampling sites and, in washing vegetables water (WVW) (*Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., helminths, *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp.), Group II - lettuce from organic open fairs in the capital, from the same cultivation region (helminths and other intestinal protozoa) and, Group III – RTE pooled packages from two producers (n=10 samples/pool) (protozoa, helminths and FIB). The isolation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water samples was performed by the membrane filtration technique followed by Direct Immunofluorescence assay (IFA) and FIB by the chromogenic substrate method Colilert® and Enterolert®. The contamination by parasites in vegetables from open markets and RTE vegetables was carried out by washing the leaves with glycine (1M) followed by centrifugation to obtain pellets, which were analyzed by optical microscopy and IFA, respectively. Moreover, the contamination by *Giardia duodenalis* was also measured by amplification of four molecular markers by Nested-PCR. Contamination by at least one of the protozoa was identified in 40% of the WVW samples, as well as the presence of *Balantioides coli* cysts, in equal proportion. FIB were detected in all samples of Group I, with the highest concentrations of contamination being evidenced for *Enterococcus* sp. For Group II, 16.3% of the samples exhibited contamination by parasites, with the highest prevalence rate detected for *Balantioides coli* cysts, followed by the contamination of eggs of *Ancylostomatidae* family, *Ascaris* spp., *Trichuris* sp., and *Hymenolepis nana* on the same proportion. Contamination by *Giardia* was detected in 25% of the RTE pooled samples from both producers by immunological or molecular techniques, with the highest rates of contamination evidenced for producer I. *Giardia duodenalis* was identified in both producers of RTE vegetables, being the genetic group B identified in two pools of samples from the producer I. This is the first report of contamination by *Giardia duodenalis* belonging to a genetic group with infective potential for humans in RTE vegetables in Brazil. The results highlights the importance of monitoring different critical points in the vegetables production chain, aiming to minimize the occurrence of foodborne diseases and their impacts on public health.

Keywords: Helminths, Irrigation Water; Molecular Characterization; Organic vegetables; Protozoa; Ready-to-Eat.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos que avaliaram a contaminação por parasitos em hortaliças oriundas de diferentes tipos de cultivo no Brasil mundo.....	13
Tabela 2 - Estudos recentes que avaliaram a contaminação por <i>Cryptosporidium</i> spp., e <i>Giardia</i> spp., em água de irrigação no Brasil e no mundo.....	17
Tabela 3 - Espécies aceitas de <i>Cryptosporidium</i> em diferentes classes de vertebrados e sítios de parasitismo.....	28
Tabela 4 - Número de <i>pool</i> amostrais analisados de minimamente processados oriundos de dois produtores adquiridos em supermercados de Curitiba.....	59
Tabela 5 - Critérios utilizados para avaliação da qualidade sanitária dos vegetais <i>in natura</i> ou prontos para o consumo de acordo com as preconizações de legislações vigentes no Brasil.....	62
Tabela 6 - Monitoramento da contaminação por cistos de <i>Giardia</i> spp., e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp., em diferentes amostras utilizadas para irrigação e lavagem de hortaliças orgânicas em Rio Branco do Sul mediante adoção de critérios estipulados pela USEPA.....	65
Tabela 7 - Concentração de bactérias indicadoras expressas em número mais provável (NMP /100mL) e aferição de fatores físico-químicos monitorados durante cinco meses em diferentes pontos de água destinada à irrigação e lavagem de hortaliças na etapa de cultivo (Grupo I), em Rio Branco do Sul.....	68
Tabela 8 - Avaliação da qualidade da água destinada ao consumo humano de produtores rurais da região metropolitana de Curitiba, Paraná.....	69
Tabela 9 - Frequência de formas parasitárias detectadas em hortaliças provenientes de cultivo orgânico na etapa de comercialização (feiras livres) (Grupo II)	70
Tabela 10 - Monitoramento da contaminação por <i>Giardia</i> em vegetais minimamente processados por reação de imunofluorescência direta (RID) ou por amplificação de diferentes <i>locus</i> por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	71
Tabela 11 - Concentração de bactérias indicadoras expressas em número mais provável (NMP /100mL) presentes em amostras de vegetais minimamente processados de dois diferentes produtores (Grupo III)	77
Tabela 12 - Critérios utilizados para avaliação da qualidade sanitária dos vegetais prontos para o consumo de acordo com as preconizações de legislações no Brasil.....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Lista de iniciadores utilizados para amplificação do fragmento <i>18S rRNA</i> de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	45
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Grupos de amostragem relativo à cadeia produtiva de hortaliças para o monitoramento de parasitos e indicadores bacteriológicos.....33
- Figura 2** - A) Localização da cidade de Rio Branco do Sul – região metropolitana de Curitiba, Paraná eleita para monitoramento da qualidade da água de irrigação de hortaliças orgânicas e principais locais de comercialização pós etapa de cultivo. B) Coleta de amostras hídricas previamente à irrigação de hortaliças.....34
- Figura 3** - Ponto de amostragem referente à água d irrigação utilizada para o cultivo de hortaliças orgânicas e lavagem de vegetais no município de Rio Branco do Sul, região metropolitana de Curitiba.....36
- Figura 4** - Cisto de *Balantioides coli* detectado em água de lavagem de hortaliças cultivadas em Rio Branco do Sul, Paraná. A seta evidencia a presença de macronúcleo. Aumento: 400X.....66
- Figura 5** - A. Ovo de *Trichuris* spp., B. oocisto de *Isospora* sp. C. Ovo da família Ancylostomatidae. Aumento: 400x.....70
- Figura 6** - Amostra positiva pela amplificação do gene *TPI* (530 pb) para *G. duodenalis* por nested-PCR e eletroforese em gel de agarose agarose.....72
- Figura 7** - Relação filogenética entre os grupos genéticos de *Giardia duodenalis* pelo gene *TPI* inferido pelo método Neighbour Joining com bootstrap de 2000 réplicas.....74

LISTA DE PRANCHAS

Prancha 1 - Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cisto de <i>Giardia</i> spp., detectados em água utilizada para irrigação e lavagem de hortaliças orgânicas	65
Prancha 2 - Cistos de <i>Giardia</i> spp., detectados em amostras de vegetais minimamente processados (Produtor I)	72
Prancha 3 - Artrópodes / fragmentos visualizados com auxílio de microscopia óptica e uso de lugol em amostras de vegetais minimamente processados.....	75

LISTA DE SIGLAS

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DAPI - 4,6-diamidino-2-phenylindole

DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos

FDA - Food and Drug Administration

FISH - Fluorescence in Situ Hybridization

FSMA - Food Safety Modernization Act

GAP - Good Agricultural Practices

HACCP - Hazard Analysis and Critical Control Point

IMS - Immunomagnetic Separation

IFA - Immunofluorescence Assay

NMP - Número mais provável

MWQP - Microbial water quality profile

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

RID - Reação de imunofluorescência direta

USEPA - United States Environmental Protection Agency

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Histórico do uso de agrotóxicos e a agricultura orgânica: implicações em saúde pública	17
2.2 Segurança dos alimentos: legislações para garantia da qualidade da água de irrigação e de vegetais destinados ao consumo humano no Brasil	19
2.3 Impacto das doenças transmitidas por alimentos: cooperações globais de controle	22
2.3.1 Ocorrência de parasitos como contaminantes de hortaliças no mundo	24
2.4 Gênero <i>Giardia</i>	31
2.5 Gênero <i>Cryptosporidium</i>	37
3. OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo geral	45
3.2 Objetivos específicos	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Delineamento experimental e pontos de amostragem	46
4.2 Grupo I - Coleta e análise de amostras hídricas destinadas à irrigação e lavagem de hortaliças (etapa de cultivo)	47
4.2.1 Processamento das amostras hídricas	0
4.2.1.1 Pesquisa de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em água de irrigação e lavagem de hortaliças orgânicas	0
4.2.1.2 Visualização dos protozoários por reação de imunofluorescência direta (RID)	0
4.2.1.3 Cálculo da concentração de cistos e oocistos nas amostras hídricas	3
4.2.1.4 Caracterização molecular de <i>Giardia</i> spp	4
4.2.1.5 Amplificação de DNA por <i>Nested-PCR</i>	4
4.2.1.6 Caracterização molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp	8
4.2.1.7 Pesquisa de outros parasitos em água de lavagem dos vegetais	10
4.2.1.8 Análises microbiológicas e físico-químicas	11

4.3 Grupo II - Análise da contaminação ambiental de alface (<i>Lactuca sativa</i>) por parasitos: etapa de comercialização (feiras-livres).	12
4.4 Avaliação da qualidade microbiológica e parasitológica de hortaliças frescas, <i>in natura</i> , preparadas (sanificadas, fracionadas e refrigeradas) prontas para o consumo (Grupo III).....	13
4.5 Interpretação dos resultados da qualidade sanitária dos vegetais.....	16
5. RESULTADOS	17
5.1 Monitoramento da qualidade microbiológica e parasitológica da água utilizada para o cultivo de hortaliças orgânicas no município de Rio Branco do Sul (Grupo I).....	17
5.1.1 Detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. em água de irrigação e de lavagem de hortaliças.	17
5.1.2 Ocorrência de ovos ou larvas de helmintos e outros protozoários intestinais na água de lavagem de hortaliças orgânicas.	1
5.1.3 Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química da água destinada a irrigação e lavagem de hortaliças orgânicas.	2
5.1.4 Avaliação da qualidade da água de poço destinada ao consumo humano.....	1
5.2. Ocorrência natural de parasitos em alfaces orgânicas comercializadas em feiras-livres de Curitiba (grupo II).	1
5.3 Monitoramento da ocorrência de parasitos, bactérias e sujidades microscópicas em vegetais minimamente processados destinados ao consumo humano (Grupo III).....	3
5.3.1 Contaminação por oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e cistos de <i>Giardia</i>	3
5.3.2 Contaminação por helmintos, (oo) cistos de outros protozoários e sujidades	7
5.3.3 Contaminação por indicadores de contaminação fecal.....	8
5.3.4 Interpretação dos resultados da qualidade sanitária dos vegetais minimamente processados.....	0
6. DISCUSSÃO	0
7. CONCLUSÕES	19
8. REFERÊNCIAS	21
ANEXO I: ARTIGO PUBLICADO ORIUNDO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO	49

1. INTRODUÇÃO

A produção de alimentos orgânicos está associada a um modelo de desenvolvimento sustentável, impulsionando uma crescente demanda por estes produtos em todo o mundo (Hurtado-Barroso et al., 2017). O cultivo deste tipo de alimento também é atualmente estimulado em detrimento ao cultivo convencional em sistemas alimentares e o agronegócio. Este último, comumente está associado à utilização de pesticidas ou agrotóxicos, também denominados de defensivos agrícolas, cuja exposição contínua em hortaliças tem sido correlacionada ao aparecimento de diversas patologias, incluindo alguns tipos de cânceres, distúrbios hormonais, respiratórios e alérgicos (Van Maele-Fabry et al., 2011; Jabionska-Trypuc et al., 2017; Kim et al., 2017).

A produção local de alimentos orgânicos nos países da América do Norte e Europa não possui capacidade para atender a demanda interna por produtos tropicais e contra sazonais, gerando uma crescente dependência por importações de países em desenvolvimento (Reganold et al., 2016).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) constituem um problema global de saúde pública, gerando impactos negativos nos sistemas públicos de saúde, nos meios de subsistência de grandes grupos populacionais e no comércio internacional de alimentos - como a diminuição do valor de mercado dos produtos - particularmente em zonas rurais produtoras (FAO, 2014; Faour-Klingbeil e Todd., 2019).

Estas doenças são responsáveis por grande parte dos surtos de gastroenterite em todo o mundo, sendo as bactérias, vírus e parasitos os principais agentes etiológicos incriminados, acometendo cerca de 600 milhões de pessoas por ano - aproximadamente um a cada 10 indivíduos (WHO, 2015, Faour-Klingbeil e Todd, 2019). Mundialmente, as doenças

parasitárias infectam 407 milhões de pessoas por ano, destes, 22% (91,1 milhões de casos) e aproximadamente 52 mil óbitos anuais, são ocasionados por parasitos transmitidos por alimentos (Torgerson et al., 2015, Chalmers et al., 2020).

As infecções parasitárias de origem alimentar são consideradas negligenciadas no contexto das doenças transmitidas por alimentos (DTA) quando comparadas às infecções virais e bacterianas (Robertson, 2018, FAO, 2020, Giessen et al., 2021).

Um conjunto de fatores está associado à subnotificação de casos e/ou dificuldades na investigação e determinação de agentes etiológicos de doenças parasitárias envolvidos em surtos, entre eles: os complexos ciclos biológicos dos parasitos, bem como o caráter zoonótico e/ou antroponótico e sua ampla distribuição (Robertson, 2018; Ryan et al., 2019). Além disso, as parasitoses frequentemente exibem longos períodos de incubação - com desenvolvimento de sintomatologia branda e inespecífica - dificultando o diagnóstico e intervenção clínica, favorecendo a manutenção da infecção em portadores assintomáticos e a perpetuação da contaminação ambiental, hídrica e alimentar (Xiao et al., 2018, Sakkas et al., 2020, Teimouri et al., 2021).

Os métodos envolvidos em investigações de surtos de DTA são tradicionalmente baseados na coleta de amostras e cultivo microbiano, em contraponto, para parasitos, encontra-se pequenas quantidades de formas infectantes (ovos, cistos e oocistos) em amostras ambientais, bem como baixa concentração de material genético - visto que diferentemente de bactérias, não se multiplicam em amostras alimentares (Chavez-Ruvalcaba, 2021).

Diante deste cenário, para o monitoramento ou detecção de parasitos em alimentos, muitas vezes se faz necessário o emprego de tecnologias que apresentam maior sensibilidade e acurácia de detecção, como as ferramentas imunológicas associadas a ferramentas moleculares,

de alto custo, e não preconizadas nas rotinas laboratoriais de grande parte dos órgãos de vigilância sanitária e epidemiológica (BRASIL 2010, Ryan et al., 2019).

A transmissão de helmintos e protozoários parasitos por veiculação hídrica e alimentar apresenta relevância, sendo a transmissibilidade favorecida por razões tais como: ovos, cistos e oocistos de parasitos intestinais exibem marcada resistência e sobrevivência no ambiente, devido à presença de parede cística robusta e / ou diversas membranas formadas de quitinas e outros constituintes que atuam como uma barreira a um grande conjunto de estressores físico-químicos (Dumétre et al., 2011; Sadowska et al., 2019). Em adição, esses estádios parasitários são resistentes a processos de desinfecção comumente empregados para potabilizar a água, como a cloração e o uso de hipoclorito de sódio como sanitizante em hortaliças (Dumétre et al., 2011; Fallah et al., 2012;).

Entretanto, apesar do número de relatos da contaminação em diferentes matrizes alimentares ser considerado emergente, ainda se observa subnotificação de surtos associados a parasitos pela via alimentar, visto que não são contemplados como agentes infecciosos de notificação obrigatória no Brasil e em muitos países do mundo (Brasil, 2010; Ahmed e Karanis, 2018; Ryan et al., 2019).

Alguns estudos demonstraram que a principal fonte de contaminação de alimentos frescos, como frutas e vegetais, consiste na utilização da água de irrigação contaminada (Giangaspero et al., 2015; Troldborg et al, 2017; Moreno et al., 2018). A contaminação por parasitos em hortaliças pode estar intimamente relacionada a outros pontos críticos de controle empregados em diferentes etapas da cadeia produtiva, como colheita, manipulação, transporte, preparação e /ou durante o processamento industrial (Duedu et al., 2014; Mohamed et al., 2016; Javanmard et al., 2018).

O estilo de vida contemporâneo aliado ao aumento da participação das mulheres no mercado de trabalho vem induzindo mudanças no perfil do consumidor, que busca por maior praticidade. Estes fatores contribuem para o crescente aumento na demanda por alimentos prontos para o consumo, especialmente os vegetais frescos minimamente processados (Giangaspero et al., 2015; Caradonna et al., 2017.)

A ocorrência de parasitos em vegetais, especialmente alface de cultivo convencional, é amplamente reportada na literatura, contudo, observa-se escassez de dados acerca da contaminação por parasitos em hortaliças provenientes de cultivo orgânico e, são ainda mais escassos ou inexistentes, dados acerca da contaminação e caracterização molecular de protozoários patogênicos como *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp., em vegetais minimamente processados destinados ao consumo humano no mundo (Dixon et al., 2013; Ryan et al., 2019).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico do uso de agrotóxicos e a agricultura orgânica: implicações em saúde pública.

A chamada Revolução Verde iniciada nos Estados Unidos entre as décadas de 1950 e 1960 foi promovida com o desígnio de acompanhar o crescimento populacional e o conseqüente aumento na demanda por alimentos. Os anos pós-revolução foram marcados pela introdução de inovações tecnológicas na agricultura, extensivamente baseadas no uso de agentes químicos, como os pesticidas e agrotóxicos (Pimentel, 1996, Pingali, 2012, Karunarathne et al., 2019).

O sistema agroalimentar convencional empregado mundialmente nas últimas décadas tem favorecido substancialmente os efeitos de degradação ambiental, como o aumento do

suprimento de nitrogênio reativo, eutrofização de solo, deterioração de corpos hídricos e perdas na biodiversidade nativa (Popp et al., 2013, Karunarathne et al., 2019). Cenário este, que representa o grande desafio do século: conter os impactos ambientais negativos associados ao sistema agrônomo, garantindo quantidade e qualidade suficientes para atender a demanda e assegurar os aspectos de segurança alimentar e segurança dos alimentos (FAO, 2013, Mueller et al., 2017).

No Brasil, a Revolução Verde se iniciou na década de 1960, adquirindo maior expressividade na década de 70, quando foi fortemente incentivada pela criação do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA), que condicionava a concessão e ampliação de créditos agrícolas ao uso de agroquímicos. O incentivo estatal e os subsídios contribuíram para a ampliação do uso de substâncias sintéticas, antes utilizadas apenas por grandes latifundiários, para pequenos agricultores familiares (Lopes e Albuquerque, 2018).

O mercado de agroquímicos obteve expressiva expansão na última década no Brasil, sendo este elencado em primeiro lugar no ranking mundial de consumo de agrotóxicos desde o ano de 2008. A região Sul consome aproximadamente 30% da quantidade total de agrotóxicos utilizada no país: o estado do Paraná se sobressai com uma média de 12 kg por hectare/ano, diante da média nacional de 4 kg/hectare/ano, considerada elevada (Neves e Bellini, 2013, Lopes e Albuquerque, 2018).

O movimento acerca da agricultura orgânica iniciou-se nos países europeus em meados da década de 1920, e segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), este tipo de cultivo consiste em um sistema de produção holística para a melhoria da saúde do agro ecossistema, com proteção à biodiversidade e respeito à atividade biológica do solo (FAO, WHO, 1999; Lotter, 2003, Brantsæter et al., 2017).

De acordo com relatório publicado pelo Instituto de Pesquisa em Agricultura Orgânica (FiBL) e pela Federação Internacional de Movimentos de Agricultura Orgânica

(IFOAM) houve um aumento de 14,7% na extensão de terras destinadas ao cultivo de alimentos orgânicos até o ano de 2015 no mundo (Willer e Lernoud, 2017). Dentre os países com as maiores áreas certificadas para a produção de alimentos orgânicos, estão territórios da Ásia, África e América Latina (Codex Alimentarius FAO / OMS, 1999, IAASTD, 2009, Reganold et al., 2016, Willer e Lernoud, 2019).

O mercado de orgânicos compõe uma série de gêneros alimentícios, como frutas e hortaliças *in natura*, cereais, produtos de origem animal e produtos minimamente processados. Esse nicho movimentou aproximadamente US\$ 97 bilhões na última década, um número quase cinco vezes maior do que o gerado no período entre 1999 e 2013 (Willer e Lernoud, 2019).

O crescimento exponencial do mercado de orgânicos associado à transição no perfil do consumidor implicam em grandes desafios aos setores públicos, com vistas ao fortalecimento e a construção de políticas públicas direcionadas a toda a cadeia produtiva (Kriwy e Mecking., 2011, Wang et al., 2020).

2.2 Segurança dos alimentos: legislações para garantia da qualidade da água de irrigação e de vegetais destinados ao consumo humano no Brasil.

Os indicadores bacteriológicos de contaminação fecal (IBCF) são considerados os principais parâmetros de limites que separam unidades amostrais em qualidade aceitável ou inaceitável dentro de todos os setores da cadeia produtiva de alimentos no Brasil destinados ao consumo humano (BRASIL, 2019).

Dentre as bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* está entre as mais estudadas em todo o mundo, classificada como membro da família Enterobacteriaceae na classe Gammaproteobacteria, sendo usualmente utilizada como um dos principais indicadores de contaminação fecal em diferentes amostras, inclusive alimentares (Jang et al., 2017).

Ressalta-se a importância do entendimento da ecologia e epidemiologia ambiental desta bactéria, visto que apresenta expressiva sobrevivência fora do trato gastrointestinal, podendo reproduzir-se rapidamente no ambiente, especialmente em regiões de clima tropical e subtropical (Ishii e Sadowsky, 2008).

Enterococcus sp. são bactérias gram-positivas encontradas no trato gastrointestinal de mamíferos homeotérmicos, podendo ser utilizada como parâmetro complementar de qualidade sanitária de amostras ambientais por indicar contaminação por esgoto ou fezes (humana ou animal). Este grupo é reconhecido por sua ampla característica de resistência a fatores ambientais, auxiliando na elucidação da contaminação fecal em amostras ambientais (Soller et al., 2010).

Entre as normas regulatórias vigentes para avaliação da segurança de hortaliças para o consumo humano no Brasil, os componentes dos critérios microbiológicos de alimentos consideram a ausência ou presença de um dado microrganismo, incluindo parasitos, bem como, a quantidade de toxinas bacterianas e/ou de seus metabólitos secundários a depender da matriz alimentar (Codex Alimentarius, 2006, Hoang et al., 2018, BRASIL, 2014, 2019).

No Brasil, em dezembro de 2020 passou a vigorar a resolução nº 331 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicada em 23 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2019), que estabelece os padrões microbiológicos de alimentos e seus parâmetros acerca dos processos de produção, transporte, armazenamento, distribuição e comercialização, revogando a antiga RDC nº12 (BRASIL, 2001), que estabelecia os parâmetros microbiológicos dos alimentos destinados ao consumo humano.

Associada a nova resolução vigente, a instrução normativa (IN) nº 60 / 2019 estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos, definindo os critérios de aceitabilidade de um lote (BRASIL, 2019) e institui: para hortaliças, raízes, tubérculos, fungos comestíveis e

derivados *in natura* (inteiros, selecionados ou não) devem apresentar ausência de *Salmonella* sp. em 25g do produto, e perfil microbiológico de no máximo 10^3 para *Escherichia coli/g*.

Para os alimentos prontos para o consumo da mesma categoria (inteiros, descascados ou fracionados), sanificados, branqueados, refrigerados ou congelados - que não necessitam de tratamento térmico efetivo previamente ao consumo - devem apresentar os mesmos parâmetros para *Salmonella* sp. e perfil microbiológico de no máximo 10^2 para *Escherichia coli/g* (BRASIL, 2019).

Do ponto de vista técnico, produtos minimamente processados, podem ser definidos como qualquer fruta ou hortaliça, que tenha sido fisicamente alterada, mas que permaneça em estado fresco, ou seja, alimentos *in natura* que passam por etapas de transformação (sanitizar, selecionar, cortar, ralar, picar). A ideia central é assegurar ao consumidor a conveniência, praticidade, e segurança do alimento sem perda de qualidade nutricional (Santos et al., 2010).

Ademais, a RDC nº14/2014 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências, define que matérias estranhas indicativas de riscos à saúde humana são aquelas detectadas macroscopicamente e/ou microscopicamente, capazes de veicular possíveis patógenos para os alimentos e/ou de causar danos ao consumidor. Estabelece ainda, que os alimentos destinados ao consumo humano, devem apresentar ausência de parasitos, helmintos e protozoários, em qualquer fase de desenvolvimento (BRASIL, 2014).

A mesma resolução define ainda, que alimentos deteriorados são aqueles que apresentam alterações das características sensoriais, físicas ou químicas, em decorrência da ação de microrganismos e/ou por reações químicas e/ou alterações físicas, sendo consideradas em desacordo com a norma vigente (BRASIL, 2014).

No que se refere a água de irrigação na etapa de cultivo de vegetais, a resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) determina que a irrigação de

hortaliças que são ingeridas cruas, sem remoção de película, deve ser realizada com águas de classe I e II.

Para este fim, os padrões microbiológicos não devem ultrapassar 200 coliformes termotolerantes por 100 mL para águas de classe I e 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mL para águas de classe II.

A detecção e enumeração bacteriológica em ambas as classes deverá alcançar os parâmetros estabelecidos em no mínimo 80% ou mais de um número amostral mínimo igual a seis amostras coletadas em um período de um ano com frequência bimestral, para garantia da qualidade microbiológica da água destinada à irrigação de hortaliças.

Além disso, no ano de 2016 foi publicada a ISO n° 18744 que estabelece um padrão internacional para detecção e enumeração de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em vegetais verdes folhosos frescos e frutos de baga. Esta norma concebe a detecção das formas infectantes dos protozoários através da utilização de técnicas de concentração, purificação e visualização dos protozoários mediante emprego de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo por reação de imunofluorescência direta (ISO 18744, 2016).

Ressalta-se, no entanto, que o método preconizado pela ISO, não contempla análises moleculares para determinação de espécies, genótipos ou grupos genéticos potencialmente patogênicas a seres humanos (ISO 18744, 2016).

2.3 Impacto das doenças transmitidas por alimentos: cooperações globais de controle.

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são responsáveis por 33 milhões de DALYs (*Disability Adjusted Life Years*) a cada ano, número este, semelhante ao das três grandes doenças infecciosas listadas como prioritárias pela Organização Mundial da Saúde (OMS) - HIV / AIDS, malária e tuberculose (WHO, 2015).

De acordo com relatório do Banco Mundial realizado em 2018, o custo total de perdas econômicas ocasionadas pelos impactos das DTA nos países em desenvolvimento é estimado em aproximadamente US \$ 95,2 bilhões por ano, e o tratamento destas enfermidades, onera para os sistemas públicos de saúde destes países, um total anual de U\$ 15 milhões (IBRD-IDA, 2018).

O planejamento proposto pela OPAS (Organização Pan-americana da Saúde) em consonância com a OMS se baseia em seis linhas estratégicas, as quais buscam combater o impacto global das doenças tropicais negligenciadas, entre elas as parasitoses, para o período de 2016-2022: 1 - fortalecer a vigilância, o diagnóstico e o manejo dos casos clínicos das DIN (doenças infecciosas negligenciadas); 2 - fortalecer a quimioterapia preventiva e aumentar o acesso à assistência básica de saúde voltada às DIN; 3 - fortalecer o manejo integrado de vetores; 4 - fortalecer a prevenção das zoonoses negligenciadas específicas por meio de um enfoque em saúde única; 5 - adotar abordagens intersetoriais visando reduzir o risco de transmissão das DIN por meio do acesso à água potável, saneamento básico, higiene e melhores condições de habitação; e 6 - incorporar abordagens inovadoras apoiadas por pesquisas e implementações científicas para eliminar a transmissão destas doenças (PAHO, 2016).

Além dos impactos em saúde pública, a escassez de dados epidemiológicos representa o grande obstáculo para a alocação de recursos direcionados a políticas públicas de segurança dos alimentos, especialmente no que se refere aos parasitos transmitidos por essa via (Dixon et al., 2013; Ortega-Pierres et al., 2018).

Além disso, com o intuito de dimensionar os reais impactos em saúde pública, fornecer dados acerca das doenças de origem alimentar e contribuir para o fortalecimento na condução de medidas de intervenção de controle pelos países, o mesmo departamento, elaborou uma iniciativa para estimar a carga global de doenças transmitidas por alimentos (WHO, 2015).

Em 2019, a Conferência Internacional de Segurança Alimentar reforçou o protagonismo da segurança dos alimentos para o cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, e reiterou o papel dos governos para a inclusão da problemática nas agendas governamentais como prioridade em saúde pública, dado o papel central dos órgãos públicos e fiscalizadores nas regulamentações nacionais e internacionais de diferentes tipos de alimentos (FAO/WHO/AU, 2019).

A Conferência também ressaltou a importância do desenvolvimento de sistemas eficazes para a gestão dos riscos nas cadeias produtivas, tendo em vista a garantia da inocuidade dos alimentos destinados ao consumo humano em escala global.

A garantia da segurança dos alimentos representa um dos maiores desafios globais, visto que surtos de origem alimentar podem ocasionar grandes contingências sanitárias internacionais, em virtude da crescente industrialização e intensificação do comércio internacional de alimentos (WHO, 2020).

2.3.1 Ocorrência de parasitos como contaminantes de hortaliças no mundo.

De acordo com a OMS, práticas inadequadas na manipulação de alimentos, consumo de alimentos crus (como frutas e vegetais), ausência ou condições precárias de saneamento básico, além da escassez de recursos hídricos potáveis são os principais fatores que contribuem para a elevada carga de doenças parasitárias nos países em desenvolvimento (OMS, 2019).

Um grupo de especialistas reunidos pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e pela OMS, desenvolveu em 2012 um ranking para deliberar o impacto global dos principais parasitos transmitidos por alimentos, de acordo com a carga global da doença, distribuição geográfica, morbidade associada, número de casos fatais, relevância e emergência, além de impactos econômicos em populações socialmente vulneráveis (FAO/WHO 2014).

Dentre os parasitos elencados associados a produtos frescos como os vegetais e de maior risco à saúde humana, os helmintos aparecem nas primeiras posições: 1º *Taenia solium*, 2º e 3º *Echinococcus granulosus* e *E. multilocularis* e, relevância para *Ascaris* spp., e *Trichuris trichiura*, na nona e 15ª posição respectivamente. Dentre os protozoários, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Cyclospora cayetanensis* e *Balantidium coli* (atualmente *Balantiodes coli*) são mencionados como os mais relevantes (FAO/WHO 2014).

Ressalta-se que a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) e a OMS destacam que nos países em desenvolvimento e emergentes, incluindo o Brasil, os helmintos transmitidos pelo solo (HTS) e por alimentos contaminados - em especial *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* - ainda apresentam ampla disseminação e agravos em saúde (PAHO, 2016). A contaminação natural por diversas espécies de helmintos e protozoários intestinais em hortaliças vem sendo reportada no Brasil e em diversos países do mundo, no entanto, observa-se escassez de estudos relacionados a pesquisa de parasitos em vegetais orgânicos e minimamente processados (Tabela 1).

Tabela 1: Estudos que avaliaram a contaminação por parasitos em hortaliças oriundas de diferentes tipos de cultivo no Brasil e no mundo.

Tipo de amostra	Local	Principais resultados	Metodologia de detecção	Referência
VEGETAIS ORGÂNICOS				
Vegetais, solo e água de irrigação.	Londrina, Brasil	Total de vegetais contaminados: 28,6%. <i>Cryptosporidium parvum</i> - 11,3% no total. <i>G. intestinalis</i> – detectado em 25,8%, das quais 12 amostras eram vegetais.	Nested-PCR e sequenciamento.	Ferreira et al., 2018.
Vegetais diversos orgânicos e não orgânicos	Maringá Brasil	7,3% de contaminação por <i>Giardia duodenalis</i> .	Lavagem com Tween 80, filtração em membrana e PCR e PCR-RFLP.	Rafael et al., 2017.
Vegetais diversos orgânicos e não orgânicos	Maringá Brasil	Detecção de DNA do protozoário <i>Toxoplasma gondii</i> em diferentes vegetais.	PCR.	Marchioro et al., 2016.
Alface (<i>Lactuca sativa</i>) de diferentes sistemas de produção.	São Paulo, Brasil.	Contaminação total: 28,2% (<i>Entamoeba</i> spp., Tricostromgídeo, <i>Strongyloides</i> spp.,).	Método de Faust. e visualização por lugol.	Santos et al., 2016.
Vegetais, frutas e solo	Polônia.	Contaminação total: 18,9% (ovos de <i>Toxocara</i> spp., <i>Ascaris</i> spp. e <i>Trichuris</i> spp.).	Método de flutuação modificado.	Klapéc e Borecka, 2012.
VEGETAIS PRONTOS PARA O CONSUMO (READY-TO-EAT)				
Vegetais na etapa de cultivo e vegetais prontos para consumo.	Tabriz, Iran.	<i>Entamoeba coli</i> , <i>Giardia</i> spp., <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Taenia</i> spp., <i>Hymenolepis nana</i> , <i>Toxocara cati</i> , <i>Toxocara canis</i> e <i>Ascaris lumbricoides</i> .	Pesquisa de coccídios: Ziehl-Neelsen modificado. Outros protozoários helmintos: lavagem em solução salina fisiológica (NaCl 0,95%), flutuação em sulfato de zinco.	Hajipour et al., 2021.

Vegetais prontos para o consumo.	Foggia, Itália.	<i>C. cayetanensis</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>T. gondii</i> , <i>G. duodenalis</i> (assembleia A).	RID, nested-PCR, semi-nested PCR e sequenciamento.	Caradonna et al., 2017.
Diversos vegetais prontos para o consumo	Brasília, Brasi	<i>Entamoeba</i> sp., <i>Balantidium coli</i> , Ancilostomatídeos, <i>Strongyloides</i> sp., <i>Ascaris</i> sp.; <i>Trichuris</i> sp.	Lavagem em água destilada e análise do sedimento por lugol.	Maldonado et al., 2019.
Vegetais prontos para o consumo.	Ontario, Canada.	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>G. duodenalis</i> (assembleia A).	RID, nested - PCR e sequenciamento.	Dixon et al., 2013.

VEGETAIS DE CULTIVO CONVENCIONAL*

Vegetais de cultivo convencional.	Sarawak, Malásia.	Larvas de nematódeos, cistos de <i>Giardia</i> spp., e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	Solução saturada de sacarose e RID (<i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i>).	Tahar et al., 2021.
Vegetais frescos diversos.	Sul da Tailândia.	<i>Strongyloides stercoralis</i> , <i>Trichuris trichiura</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> e <i>Toxocara</i> spp.	Sedimentação espontânea (HPJ).	Punsawad et al., 2019.
Vegetais cultivo convencional - varejo e etapa de cultivo.	Shiraz, Iran.	<i>Giardia</i> spp., <i>Taenia</i> spp. <i>Trichostrongylus</i> , <i>Ascaris</i> spp., <i>Hymenolepis nana</i> , <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Trichuris</i> spp.	Sedimentação espontânea. <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. - Ziehl-Neelsen modificado e Giemsa, respectivamente.	Asadpour et al., 2016.
Vegetais diversos.	Khartoum state, Sudão.	<i>Entamoeba histolytica/dispar</i> , <i>Entamoeba coli</i> , <i>Giardia</i> spp., <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Strongyloides stercoralis</i> , <i>T. trichiura</i> e <i>Ancilostomatídeos</i> .	Método de Ritchie (1948) - centrífuga sedimentação em formol-éter.	Mohamed et al., 2016.

Vegetais diversos.	Tabuk, Arábia Saudita.	<i>Entamoeba coli</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> , larva de <i>Strongyloides</i> , <i>Taenia</i> spp., <i>Giardia</i> ; <i>H. nana</i> .	Método de Willis - flutuação em solução saturada de NaCl.	Gabre, Shakir, 2015.
Vegetais diversos.	Benha, Egito.	<i>Giardia</i> spp., <i>Entamoeba</i> spp., <i>Enterobius vermicularis</i> , <i>Hymenolepis nana</i> , <i>Hymenolepis diminuta</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> .	Centrífuga flutuação em solução saturada de NaCl. Pesquisa de coccídios: Ziehl-Neelsen modificado.	Eraky e al., 2014.
Vegetais diversos.	Borno State, Nigéria.	<i>Ascaris</i> spp., Ancylostomatidae, <i>Trichuris</i> spp., <i>Taenia</i> spp., <i>Echinococcus</i> spp., e <i>Strongyloides</i> sp.	Técnica de Bailenger - centrífuga concentração (1962).	Adamu et al., 2012.
Vegetais diversos.	Tripoli, Líbia.	<i>Ascaris</i> spp., <i>Toxocara cati</i> , <i>Toxocara canis</i> , <i>Taenia/Echinococcus</i> spp., <i>Giardia</i> spp.,	Método de Willis - flutuação em solução saturada de NaCl.	Abougrain et al., 2010.

Nota: Artigos selecionados das bases de dados de periódicos científicos: Scopus, Pubmed e Science Direct, utilizando os descritores: “Helminths”, “Protozoa”, “Parasites”, *Giardia*; *Cryptosporidium* seguidos do operador AND “Vegetables, Ready to eat, organic” *Devido ao grande volume de estudos publicados para este tipo de cultivo, apenas alguns estudos são mostrados. RID = Reação de Imunofluorescência Direta.

Apesar da contaminação de vegetais frescos, especialmente de cultivo convencional ser amplamente pesquisada e reconhecida como uma das principais vias para aquisição de helmintoses intestinais em todo o mundo (Tabela 1) ainda não existe um método ou ISO para detecção de ovos padronizado.

Na maioria dos estudos conduzidos em países em desenvolvimento, a pesquisa de cistos e ovos principalmente, é realizada por metodologias adaptadas da rotina clínica para a pesquisa de parasitos em amostras fecais humanas e / ou de animais, com etapas que envolvem a sedimentação e / ou flutuação (Abougrain et al., 2010; Mohamed et al., 2016; Punsawad et al, 2019).

Além disso, colorações específicas como Ziehl Neelsen modificado, utilizado para diferenciação e isolamento de protozoários, com característica álcool ácido resistente, restringem a acurácia para confirmação de contaminação (Eraky e al., 2014; Asadpour et al., 2016). Por conseguinte, o desenvolvimento de métodos que apresentem boa sensibilidade para detecção de parasitos emerge como importante ferramenta para avaliação da qualidade sanitária de vegetais destinados ao consumo humano (Bowman, 2021; Pineda et al., 2021).

De acordo com a Organização Mundial das Nações Unidas (ONU), estima-se que ao menos 50 países utilizem rotineiramente águas residuais ou não tratadas para a irrigação em fazendas produtoras de hortifrutícolas. A ONU tem direcionado diversos esforços que visam melhorar a qualidade química e microbiológica das águas residuais e para fins de irrigação, sendo uma das metas que compõe parte da agenda dos objetivos: Água e Desenvolvimento Sustentável (ONU 2015).

Outro aspecto atual e de preocupação global, consiste na qualidade da água utilizada para irrigação por indústrias e / ou lavagem de vegetais frescos quanto à contaminação por protozoários patogênicos na etapa de cultivo e processamento (Tabela 2).

Tabela 2: Estudos recentes que avaliaram a contaminação por *Cryptosporidium* spp., e *Giardia* spp., em água de irrigação no Brasil e no mundo.

Tipo de amostra	Local	Principais resultados	Metodologia de detecção	Referência
Água de reservatório, subterrânea, rio e reuso.	Catalunha, Espanha.	Não detectados em nenhuma amostra.	Ensaio de PCR em tempo real (qPCR).	Rusiñol et al., 2020.
Rios, canais de irrigação e abastecimento público.	Merelbeke, Bélgica	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> detectados em 25% das amostras cistos de <i>Giardia</i> (50%).	IMS/RID e PCR	Ligda et al., 2020.
Vegetais, solo e água de irrigação.	Londrina, Brasil.	<i>Cryptosporidium</i> spp. - 11,3% (7/62) e <i>G. duodenalis</i> - 25,8% (16/62) das amostras.	nested-PCR.	Ferreira et al., 2018.
Água de irrigação e lavagem.	Wageningen, Holanda.	Não houve amplificação em nenhuma amostra.	qPCR.	Ssemenda et al., 2018.
Água de superfície.	Valencia, Espanha.	<i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> – positividade em todas as amostras.	qPCR, RID/IMS.	Moreno et al., 2018.
Efluentes de estações de tratamento de águas residuais, riachos, canais de irrigação, lagos e lagoas.	Romênia Ocidental.	<i>Giardia</i> spp. 37,5% em canais de irrigação. Todos os corpos d'água monitorados: contaminação sub assembleia AII de <i>Giardia duodenalis</i> .	IMS/RID e PCR e sequenciamento.	Imre et al., 2017.
Água de irrigação - bacias hídricas.	Oslo, Noruega.	Contaminação por ambos os protozoários, identificada apenas nos períodos chuvosos.	IMS/RID.	Paruch et al., 2014.
Água de irrigação - poços artesianos, semiartesianos e mina	Paraná, Brasil.	Água de mina: contaminação por <i>Cryptosporidium</i> spp. (50%). Não foi detectada contaminação por ambos os protozoários nos demais pontos amostrais.	RID.	Tiyo et al., 2015.

Nota: * Artigos selecionados das bases de dados de periódicos científicos: Scopus, Pubmed e Science Direct, utilizando os descritores: “Irrigation water”, “*Giardia*”, “*Cryptosporidium*”, “Protozoa” seguidos do operador AND.

IMS = separação imunomagnética; RID = reação de imunofluorescência direta; PCR = reação em cadeia da polimerase; qPCR = PCR quantitativo.

Além disso, em países menos desenvolvidos, como no caso da América Latina, por vezes ocorre despejo de esgoto não tratado ou tratado parcialmente nas bacias hídricas, contribuindo para a qualidade insatisfatória das águas de irrigação, podendo transmitir e atuar como importante veículo de ovos de helmintos, cistos e oocistos de diferentes parasitos intestinais (Smith et al., 2006, Bastos et al., 2013).

2.4 Gênero *Giardia*.

Giardia duodenalis (sinonímia *Giardia lamblia* ou *Giardia intestinalis*) é um protozoário parasito unicelular, flagelado que infecta a porção superior do intestino delgado de diversos mamíferos, incluindo o ser humano (Lyu et al., 2018). Foi descrito pela primeira vez em 1681, quando o pesquisador Antonie van Leeuwenhoek analisou microscopicamente suas próprias fezes diarreicas (Ankarklev et al., 2010).

O protozoário é considerado um dos principais agentes etiológicos associados a doenças transmitidas por água e alimentos, sendo atribuído a 28,2 milhões de casos pela via alimentar, e 26,270 DALYs a cada ano (OMS, 2015). Além disso, ocupa a 11ª posição do ranking que elenca os principais parasitos transmitidos por alimentos (FAO / OMS, 2014).

A transmissão de *G. duodenalis* ocorre pela via fecal-oral e pode ter caráter direto (interpessoal ou zoonótica) ou indireto - através da ingestão dos cistos por água tratada, ingestão acidental de água bruta ou recreacional cloradas (Feng e Xiao, 2011; Efstratiou et al., 2017; Pineda et al., 2020).

Outra via importante de transmissão se refere à contaminação de alimentos por fezes humanas e/ou animais. A detecção do protozoário em diferentes matrizes alimentares, especialmente em mariscos, frutas e vegetais frescos vem sendo reportada

em diversos países, com índices de contaminação que variam entre 0,6 - 52,6% (Ryan et al., 2019, Leal et al., 2018; Dixon, 2021).

A transmissão interpessoal é frequente em locais institucionalizados onde o ambiente possa fornecer condições higiênico sanitárias favoráveis a transmissão e disseminação das formas infectantes - como centros de educação infantil, hospitais psiquiátricos e lares para idosos (Leung et al., 2019).

Recentemente, a transmissão sexual do parasito, através do sexo anal-oral tornou-se amplamente aceita por pesquisadores e demais profissionais da saúde sendo considerada uma via secundária de transmissão relevante (Pakianathan et al., 1999, Escobedo et al., 2014, Saifi et al., 2018).

Giardia duodenalis é inclusive um dos protozoários mais detectados em amostras fecais de indivíduos parasitados em todo o mundo: em países em desenvolvimento, a prevalência comumente varia entre 20 a 30%, com relatos de até 100% em determinadas populações e países e, em países desenvolvidos, a prevalência varia entre 3 a 7% (Roxström-Lindquist et al., 2006; Halliez e Buret, 2013).

No Brasil, a giardiose é considerada endêmica e alguns estados apresentam prevalência superior a 30%, caso do estado do Paraná por exemplo (Coelho et al., 2017). *Giardia* spp., também já foi isolada em diferentes amostras ambientais no país - especialmente hídricas e alimentares nas regiões sul e sudeste (Fantinatti et al., 2020).

O ciclo de vida deste protozoário envolve apenas duas formas evolutivas: os trofozoítos (fase proliferativa e vegetativa) associados com o quadro clínico da infecção, e os cistos (forma infectante e de resistência ambiental) que apresentam morfologia oval, tamanho entre 8 a 12µm, com presença de até 4 núcleos, os quais são eliminados em grande quantidade nas fezes do hospedeiro (Feng e Xiao, 2011). Ressalta-se que as

formas infectantes permanecem longos períodos viáveis no ambiente devido à presença de parede cística robusta (Cacciò et al., 2018).

Após a ingestão dos cistos, ocorre um processo denominado de excitação, influenciado pelo baixo pH estomacal e presença de sais biliares, na porção superior do intestino delgado, liberando dois trofozoítos binucleados que apresentam quatro pares de flagelos responsáveis pela alta mobilidade, além de um disco suctorial - que lhes confere capacidade de fixação às células epiteliais intestinais (Adam, 2001, Roxström-Lindquist et al., 2006, Halliez e Buret, 2013)

Os trofozoítos permanecem habitualmente no intestino delgado proximal (duodeno e jejuno) se replicando assexuadamente por divisão binária longitudinal, onde o processo de duplicação dura em média 9 a 12 horas (Pickering e Engelkirk 1988, Huang e White, 2006).

Na presença de ambiente alcalino e exposição aos sais biliares, ocorre diminuição do metabolismo e tamanho dos trofozoítos, que realizam a encistação, com perda dos flagelos e do disco suctorial, havendo duplicação dos núcleos no interior dos cistos, sendo então, liberados imediatamente infectantes nas fezes do hospedeiro (Feng e Xiao, 2011, Leung et al., 2019, Dixon et al., 2021).

Com relação ao quadro clínico da giardiose, uma das principais manifestações se refere à diarreia aguda, podendo evoluir em alguns hospedeiros, para diarreia e infecção crônica (Halliez e Buret, 2013, Certad et al., 2017, Allain e Buret 2020). Entretanto, aproximadamente 50 a 75% das infecções em humanos não apresentam sintomas, embora indivíduos assintomáticos apresentem ampla importância epidemiológica por atuarem como disseminadores de cistos nas fezes por longos períodos - seis meses ou mais (Leung et al., 2019).

A dose infectante é considerada baixa (10 cistos/hospedeiro) e o período de incubação longo, variando de uma a três semanas (Rendtorff, 1954, Roxstrom-Lindquist et al., 2006).

Quadros sintomáticos ocorrem com maior frequência em crianças menores de cinco anos e em indivíduos que apresentam algum grau de comprometimento do sistema imunológico - embora o protozoário não exiba caráter invasivo e oportunista (Einarsson et al., 2016). Na fase aguda da doença, ocorre aumento no número de evacuações (pastosa ou aquosa) e, com a evolução do quadro clínico, presença de esteatorreia e odor fétido (Halliez e Buret, 2013, Fink e Singer, 2018).

Outros sinais e sintomas incluem: mal-estar geral, náuseas, vômitos, distensão abdominal e acentuada perda de peso, sendo que a remissão dos sintomas normalmente ocorre entre duas a quatro semanas, a depender de fatores como estado nutricional, idade, história patológica pregressa e resposta imunológica do hospedeiro (Roxström-Lindquist et al., 2006, Feng e Xiao, 2011).

Embora os mecanismos de patogenicidade de *G. duodenalis* ainda sejam considerados controversos, durante o curso da infecção, uma série de eventos relacionados ao acometimento do epitélio intestinal são apontados como relacionados à sintomatologia dentre esses: apoptose dos enterócitos com aumento da permeabilidade intestinal e encurtamento das microvilosidades - podendo ocorrer atrofia e prejuízo na ação das dissacaridases - enzimas responsáveis pela hidrólise de polissacarídeos e dissacarídeos (Scott et al., 2004, Cotton et al., 2011).

Os mecanismos mais aceitos relacionados à patogenia de *G. duodenalis* envolvem produção de metabólitos secundários, liberação de substâncias citopáticas, disfunções na barreira epitelial intestinal e relacionados com a resposta imune contra o protozoário (Roxström-Lindquist et al., 2006; Halliez e Buret, 2013).

Tais acontecimentos fisiopatológicos originam má absorção de eletrólitos, água e nutrientes, com o aumento da motilidade intestinal, desequilíbrio hidroeletrólítico e ocorrência da diarreia (Panaro et al., 2007, Allain e Buret, 2020).

A giardiose é uma importante causa de desidratação e hospitalização infantil, com impactos negativos na relação peso/altura em crianças de até dois anos. Além disso, a fisiopatologia da doença está relacionada à intolerância à lactose, desequilíbrio na microbiota intestinal - levando a disbiose - além de má absorção de proteínas, gorduras, vitaminas lipossolúveis e minerais (especialmente vitamina A, E, B12, ferro, zinco e folato) (Astiazaran-Garcia et al., 2010).

Ademais, ainda que as infecções humanas assintomáticas sejam comuns, estudos recentes demonstraram que até um terço dos indivíduos acometidos podem apresentar consequências extraintestinais a longo prazo, dentre as quais - artrite, miopatias, prejuízos à função cognitiva, manifestações oculares e alergias cutâneas (Cantey et al., 2011, Halliez e Buret, 2013, Leung et al., 2019, Allain e Buret, 2020).

A associação entre giardiose e alergias / intolerâncias alimentares, pela translocação de antígenos alimentares para fora do lúmen intestinal, decorrentes da ação dos trofozoítos sobre os enterócitos foi postulada e confirmada em anos recentes (Fink e Singer, 2017).

Além disso, com a cronificação da infecção tem sido muito bem estabelecida a ocorrência e associação de síndromes pós-infecciosas, como a síndrome do intestino irritável (SII) e a síndrome da fadiga crônica (SFC), mesmo após o cessar da sintomatologia clínica (Grazioli, 2006, Fink e Singer, 2017).

Na atualidade, são reconhecidas oito espécies do protozoário que exibem marcada especificidade por hospedeiros, onde apesar da similaridade morfológica, apresentam ampla heterogeneidade genética (Ryan et al., 2019). Destas, apenas a espécie *G.*

duodenalis possui potencial infectante para seres humanos, sendo considerada como um complexo de espécies subdividido em oito assembleias ou grupos genéticos (A-H) (Feng e Xiao, 2011; Coelho et al., 2017).

Dentre esses, os grupos genéticos A e B são encontradas em humanos e uma gama de hospedeiros mamíferos como gado, animais domésticos (cães e gatos) e silvestres – apresentando grande potencial zoonótico (Ryan e Cacciò, 2013). Os demais grupos infectam hospedeiros não humanos - C e D em canídeos, E em animais com cascos, F em felídeos, G em roedores e grupo genético H em pinípedes (superfamília de mamíferos aquáticos).

No entanto, os grupos genéticos C, D, E e F também já foram eventualmente detectadas em amostras fecais humanas, especialmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (Ryan e Cacciò, 2013, Ryan et al., 2019).

Os principais marcadores moleculares utilizados para confirmação da contaminação por *Giardia* em amostras ambientais são a menor subunidade de RNA ribossomal (*SSU rRNA*), glutamato desidrogenase (*GDH*), β -giardina (*BG*) e triose fosfato isomerase (*TPI*) (Cacciò et al., 2018).

Com base em estudos de genotipagem dos diferentes marcadores moleculares (*multilocus genotyping*) estabeleceu-se que dentro dos grupos genéticos A e B existe importante variabilidade genética (AI, AII, AIII, BIII e BIV). Destes, o subgrupo AII é a mais frequentemente associado a infecções humanas, sendo importante alvo de estudos moleculares (Heywort, 2016, Ryan et al., 2019)

O advento da biologia molecular possibilitou a rastreabilidade da origem das fontes de contaminação fecal, auxiliando inclusive no esclarecimento de diversos surtos provocados pelo protozoário especialmente pela via hídrica. Em contraposição, há poucos dados epidemiológicos associados à transmissão alimentar - apenas 38 surtos por *G. duodenalis* foram devidamente documentados no mundo, todos oriundos dos Estados Unidos (EUA) (Adam et al., 2016).

2.5 Gênero *Cryptosporidium*

Cryptosporidium é um protozoário parasito oportunista pertencente ao Filo Apicomplexa e até recentemente, à Classe: Coccídia, subclasse: Coccidiomorpha, Ordem Eucoccidiorida, Família: Cryptosporidiidae, Gênero: *Cryptosporidium*, capaz de infectar todas as classes de vertebrados, incluindo seres humanos (Xiao et al., 2004; Fayer & Xiao 2007, Cavalier-Smith, 2014).

Diversos estudos baseados em dados de microscopia, bioquímicos e mais recentemente moleculares e genômicos, indicaram a necessidade de uma reclassificação taxonômica de *Cryptosporidium*, pois o protozoário possui estreita relação com as gregarinas (principalmente parasitos de invertebrados) (Ryan et al 2016).

Atualmente, o gênero *Cryptosporidium* está taxonomicamente posicionado no Filo Apicomplexa, Classe Gregarinomorpha e subclasse Cryptogregarina (Cavalier-Smith, 2014).

O comportamento e biologia similar às gregarinas esclarece algumas discrepâncias quando comparado a outros coccídios intestinais de humanos e animais – infecções associadas à região apical das células, com presença de organela alimentar, tamanho diminuto e espessura dos oocistos (paredes finas e grossas) e, ineficácia do tratamento baseado em anticoccidianos (Aldeyari e Karanis, 2015; Ryan et al., 2016).

O protozoário apresenta mais semelhanças com as gregarinas, como capacidade de reprodução em ambiente extracelular e de completar seu ciclo biológico na ausência de hospedeiros - comprovado em estudos *in vitro* utilizando-se biofilmes artificiais - visto que oocistos do protozoário iniciaram a excitação, liberando esporozoítos viáveis e, todos os estágios de desenvolvimento assexuado e sexuado do parasito foram observados (Clode et al., 2015; Ryan et al., 2016).

As gregarinas tipicamente se reproduzem por sizígia (processo em que dois trofozoítos maduros se unem) originando gametócitos. Esse processo também foi observado para *Cryptosporidium* há quase vinte anos (Hijjawi et al., 2002).

Estruturas *like-gamonte* e a formação de estruturas denominadas de gamonte gigantes – “*extra-large gigantic gamont-like cells*”, características de gregarinas, também foram observadas em biofilmes, tendo sido aventada a possibilidade desses estádios originarem oocistos maduros (Clode et al., 2015)

Cryptosporidium foi primariamente descrito em camundongos em 1907 pelo pesquisador Ernest E. Tyzzer, mas apenas em 1976 foi reconhecido como um potencial patógeno humano, quando os primeiros casos de criptosporidiose foram diagnosticados em crianças e paciente atímico (Fayer et al., 1997; Checkley et al., 2015).

Na década de 1980, com o advento da pandemia de AIDS o protozoário tornou-se amplamente conhecido e estudado, sendo então, a criptosporidiose classificada como um fator de risco para mortalidade de pacientes portadores do vírus HIV e, em fase avançada da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Fayer e Ungar, 1986, Cabada e White 2010).

A patogenicidade do protozoário varia quanto à espécie e subtipos, idade e estado imunológico do hospedeiro, podendo a infecção ser autolimitada com diarreia aguda em indivíduos imunocompetentes ou crônica, de longa duração, para indivíduos imunocomprometidos (Fayer et al., 1997; Xiao et al., 2004).

De fato, a severidade da infecção e do quadro clínico está relacionada com a concentração de linfócitos T CD4, tornando-se oportunista em contagens abaixo de 200 células/ μ l e, com risco de vida especialmente para indivíduos HIV positivos - que não aderem a terapia antirretroviral (HAART) - ou outros grupos mais vulneráveis como transplantados, leucêmicos, em tratamento quimioterápico e hemodiálise, ocasionando

diarreia crônica por mais de dois meses ou casos fulminantes com eliminação de volumes superiores a 2L de fezes aquosas/dia (Chen et al., 2002, Xiao et al., 2004, Bouzid et al., 2018, Ahmadpour et al., 2020).

Além do quadro clínico entérico característico da infecção, manifestações extraintestinais também são relatadas em indivíduos imunocomprometidos, especialmente em tecidos hepatobiliares, pulmonares e pancreáticos (Chen e Larusso, 2002, Kothavade, 2011, Chalmers et al., 2019).

Na atualidade, a protozoose é considerada a quarta principal causa de mortalidade infantil, sendo incriminada em 1,3 milhões de óbitos a cada ano em todo o mundo, número este, que representa 12,1% dos óbitos em crianças menores de cinco anos (GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators, 2016).

Nos Estados Unidos, é considerada a segunda causa de óbitos infantis, sendo somente sobrepujada pela enterite viral provocada por rotavírus, além disso, está associada a um risco duas vezes maior de mortalidade em crianças de um a até dois anos de idade (Kotloff et al., 2013; King et al., 2019).

Ressalta-se que o tratamento da criptosporidiose representa também um grande desafio em saúde pública, especialmente em situações de surto, uma vez que a Nitazoxanida é o único medicamento aprovado pelo FDA para uso pediátrico cuja eficácia é considerada baixa em imunocompetentes e ineficaz em indivíduos imunocomprometidos infectados (Cabada e White, 2010, Relat e O'connor, 2020).

A criptosporidiose possui diferentes vias de transmissão: antroponótica e zoonótica (transmissão direta) e hídrica, alimentar ou por contato com superfícies e objetos contaminados (transmissão indireta) pela ingestão de oocistos – forma infectante e de resistência ambiental (Fayer et al., 1997; Chalmers e Davies, 2010).

O contato com diferentes matrizes hídricas impactadas com esgoto também é atualmente apontado como importante via de disseminação de diferentes espécies do protozoário (Zahedi et al., 2021).

A inalação de oocistos por aerossóis também pode ser considerada como porta de entrada para a infecção pelo protozoário (Sponseller et al., 2014). Além das vias clássicas de infecção, a transmissão sexual, assim como ocorre para *G. duodenalis*, também é atualmente reconhecida (Morgan et al., 2000, Chalmers e Davies, 2010).

Cryptosporidium spp. apresenta ciclo evolutivo do tipo monoxênico sendo eurixeno e com desenvolvimento em ambiente intracelular e extra citoplasmático – em microvilosidades de células epiteliais gastrointestinais (enterócitos) (Fayer et al., 1997).

A infecção se inicia após a ingestão dos oocistos, ocorrendo a excitação com liberação de quatro esporozoítos móveis, sendo internalizados por um vacúolo parasitóforo, onde inicia o ciclo assexuado com duas merogonias (Fayer, 2004).

Sequencialmente, ocorre o ciclo sexuado (gametogonia) com produção de micro e macrogamontes e esporogonia com desenvolvimento de dois tipos de oocistos (parede fina ou grossa) - os primeiros, podem romper-se dentro do hospedeiro, gerando um ciclo de autoinfecção interna, e os oocistos de parede grossa são eliminados imediatamente infectantes nas fezes (Chalmers e Davies, 2010).

Até o momento foram descritas 44 espécies de *Cryptosporidium* em humanos e animais (Tabela 3). Deste total, 21 espécies já foram relatadas em seres humanos (Feng et al., 2018, Holubová et al., 2019, Mamedova e Karanis, 2021).

Tabela 3: Espécies aceitas de *Cryptosporidium* em diferentes classes de vertebrados e sítios de parasitismo.

Espécies	Principal (ais) Hospedeiro(s)	Local de infecção
<i>C. nasorum</i>	Peixe	Intestino
<i>C. cichlidis</i>	Peixe	Estômago
<i>C. reichenbachklinkei</i>	Peixe	Estômago
<i>C. molnari</i>	Peixe	Estômago e intestino delgado
<i>C. scophthalmi</i>	Peixe	Intestino e estômago
<i>C. huwi</i>	Peixe	Estômago
<i>C. fragile</i>	Anfíbios	Estômago
<i>C. serpentis</i>	Cobras e lagartos	Estômago
<i>C. varanii</i>	Lagartos	Estômago e intestino delgado
<i>C. ducismarci</i>	Tartarugas e outros répteis	NR
<i>C. testudines</i>	Tartarugas	NR
<i>C. meleagridis</i>	Pássaros e humanos	Intestino delgado
<i>C. baileyi</i>	Pássaros	Bursa Cloaca, taqueia
<i>C. galli</i>	Aves (frangos)	Proventrículo
<i>C. avium</i>	Aves	Íleo e ceco
<i>C. proventriculi</i>	Pássaros	Proventrículo e ventrículo
<i>C. muris</i>	Roedores	Estômago
<i>C. tyzzeri</i>	Roedores	Jejuno e íleo
<i>C. proliferans</i>	Burros, búfalo africano, cavalos e esquilo	Estômago
<i>C. apodemi</i>	Roedores	Intestino
<i>C. ditrichi</i>	Roedores e humanos	Jejuno e íleo
<i>C. occultus</i>	Roedores e gerbil	Cólon
<i>C. alticolis</i>	Roedores	Intestino delgado
<i>C. macroti</i>	Roedores silvestres	Intestino grosso
<i>C. cuniculus</i>	Coelhos e humanos	Intestino delgado
<i>C. rubeyi</i>	Esquilos	NR
<i>C. felis</i>	Gatos	Intestino delgado
<i>C. canis</i>	Cães	Intestino delgado
<i>C. wrairi</i>	Suíños	Intestino delgado
<i>C. homai</i>	Suíños	NR
<i>C. suis</i>	Suíños	Intestino delgado e grosso
<i>C. scrofarum</i>	Humanos, bezerras e javalis selvagens	Duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon
<i>C. parvum</i>	Gado, ruminantes e humanos	Intestino delgado
<i>C. andersoni</i>	Gado e camelos	Abomaso
<i>C. bovis</i>	Gado	Intestino delgado

<i>C. ryanae</i>	Gado	NR
<i>C. ubiquitum</i>	Ruminantes, roedores, primatas e humanos	NR
<i>C. pestis</i>	Gado	NR
<i>C. xiaoi</i>	Ovelhas e cabras	NR
<i>C. erinacei</i>	Ouriços	NR
<i>C. fayeri</i>	Marsupiais	Intestino delgado
<i>C. macropodum</i>	Marsupiais	Intestino delgado
<i>C. hominis</i>	Humanos	Intestino delgado
<i>C. viatorum</i>	Humanos	NR

Fonte: Mamedova e Karanis, 2021. NR = não reportado.

Aproximadamente 90% das infecções humanas são causadas pelas espécies *C. hominis* e por *C. parvum*. *C. meleagridis* é a terceira espécie mais comum em infecções humanas, considerada emergente em saúde coletiva por ser primariamente isolada de pássaros (Xiao, 2010, Ryan et al., 2014, Kopacz et al., 2019).

A criptosporidiose é uma doença cosmopolita e contemplada pelo Sistema Nacional de Vigilância de Doenças Notificáveis dos Estados Unidos e de diversos territórios pertencentes à União Europeia, além de países como Austrália (Cacciò e Chalmers, 2016, CDC, 2018). No entanto, estima-se que a maior parte dos casos em humanos também seja subnotificada nestes países (Ryan et al., 2018).

Historicamente, os surtos de veiculação hídrica são mais frequentes e amplamente reconhecidos, especialmente após a ocorrência do maior surto ocasionado pelo consumo de água potável contaminada, ocorrido na cidade de Milwaukee (USA) em 1993 - ocasião na qual os oocistos passaram pelo sistema de filtração da cidade e mais de 400.000 indivíduos foram infectados (Mackenzie et al., 1994).

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), estima-se que o surto tenha ocasionado 100 óbitos, sendo 69 portadores de AIDS, além de perdas econômicas superiores a US\$ 96 milhões (Corso et al, 2003).

Em 2010, ocorreu o segundo maior surto de veiculação hídrica associado ao protozoário, na cidade de Östersund (Suécia), afetando aproximadamente 27.000 indivíduos (Widerström et al., 2014, Ryan et al., 2018).

Atualmente, *Cryptosporidium* é classificado pela OMS como um patógeno de referência para a avaliação da qualidade da água potável, dada a ampla dispersão ambiental dos oocistos e a resistência à inativação pelos métodos de cloração comumente utilizados para a potabilização da água (WHO, 2009). Até o ano de 2016, este foi responsável por 60% (524/905) dos surtos de origem hídrica ocasionados por protozoários (Efstratiou et al., 2017).

Ademais, na última década as águas recreacionais (sobretudo piscinas) também foram reconhecidas como uma importante via de transmissão, sendo necessária a hipercloração em casos de emergência (acidentes fecais), visto que a diluição convencionalmente utilizada (0,5 a 2,5 mg / L de cloro residual livre) não é suficiente para inativação de oocistos (Cacciò e Chalmers, 2016, Pineda et al., 2020).

A transmissão do protozoário pela via alimentar apresenta relevância: 8,6 milhões de casos de DTA ocorreram em 2010 com 3.759 mortes e 296.156 DALYs/ano (OMS, 2015) sendo ranqueado na quinta posição entre os parasitos mais importantes transmitidos por alimentos (FAO, WHO 2014).

Oocistos de *Cryptosporidium* tem sido detectados em diferentes matrizes alimentares, incluindo moluscos bivalves e água mineral (Franco e Cantusio Neto 2002, Leal et al., 2008, Lucy et al., 2010, Smith e Nichols, 2010). A transmissão pelo consumo de miúdos bovinos que passaram por processo de congelamento também foi relatada, evidenciando a resistência dos oocistos quando submetidos a temperaturas negativas dos processos de congelamento (Nichols e Thom, 1985).

Até o momento, foram esclarecidos e documentados apenas 25 surtos de criptosporidiose pela via alimentar, associados a frutas e vegetais *in natura*, vegetais minimamente processados, carne crua, leite e suco de maçã não pasteurizados. Em 16 desses surtos, confirmou-se a espécie por genotipagem, sendo *C. parvum* incriminado em 81%, diferentemente dos surtos de origem hídrica, onde há um predomínio de contaminação por *C. hominis* (Mckerr et al., 2015; Efstratiou et al., 2017, Ryan et al., 2018).

Em relação a genotipagem de *Cryptosporidium* spp., a amplificação de fragmentos do gene *18S rRNA* é a mais amplamente utilizada para identificação da contaminação pelo protozoário. Além disso, o gene da glicoproteína de 60 KDa (GP60), localizado na superfície da região apical dos oocistos do protozoário, é tradicionalmente utilizado para subtipagem, por ser altamente polimórfico (O'Connor et al. 2007, Ryan et al, 2014, Xiao e Feng, 2017).

Os subtipos são classificados em - Ia, Ib, Id, Ie, If entre outros , para *C. hominis*, IIa, IIb, IIc, IId etc., para *C. parvum* e IIIa, IIIb, IIIc, IIId etc. para *C. meleagridis*. Os subtipos mais incriminados em surtos e infecções humanas são IbA10G2 (*C. hominis*) e IIaA15G2R1 (*C. parvum*) (Xiao et al., 2010, Feng et al., 2018).

Desta forma, a genotipagem permite rastrear as possíveis fontes de contaminação fecal para esclarecimentos de surtos quanto à emergência e virulência da espécie causadora (Xiao, 2010; Hassan et al., 2020).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar o monitoramento da contaminação por helmintos e protozoários patogênicos em diferentes etapas da cadeia produtiva de hortaliças cultivadas sob o sistema orgânico de produção destinado ao consumo humano em Curitiba (Paraná), como instrumento de aferição da qualidade higiênico sanitária.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade microbiológica e parasitológica de diferentes pontos relacionados à água de irrigação e lavagem de hortaliças na etapa de cultivo dos vegetais do município de Rio Branco do Sul, mediante a pesquisa de cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp., e bactérias indicadoras de contaminação fecal.
- Avaliar a eficiência de recuperação de um método de detecção de parasitos em hortaliças contaminadas artificialmente tendo como modelo ovos de *Ascaris* sp.
- Investigar a ocorrência natural de ovos de helmintos e (oo)cistos de protozoários intestinais em alfaces (*Lactuca sativa*) orgânicas comercializadas em feiras livres de Curitiba e cultivadas em Rio Branco do Sul.
- Realizar a pesquisa de indicadores bacteriológicos de contaminação fecal e a ocorrência de protozoários e helmintos em hortaliças minimamente processadas de dois produtores da região metropolitana e comercializadas em supermercados da capital do Paraná.
- Realizar ensaios de biologia molecular como ferramenta complementar para a confirmação da contaminação por *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. na etapa de cultivo e em hortaliças minimamente processadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental e pontos de amostragem

Com o intuito de abranger a avaliação da qualidade higiênico-sanitária em diferentes etapas da cadeia produtiva de vegetais orgânicos cultivados na região metropolitana de Curitiba, e comercializados na capital paranaense, o monitoramento da sanidade microbiológica e parasitológica (helmintos e protozoários), bem como da contaminação por *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp., foi efetuado contemplando três grandes grupos: Grupo I: água de irrigação e de lavagem de hortaliças orgânicas cultivadas na cidade de Rio Branco do Sul (Figura 1 A); Grupo II: hortaliças orgânicas comercializadas em feiras livres (Figura 1B); Grupo III: vegetais minimamente processados prontos para o consumo humano (*ready-to-eat-food*) adquiridos de supermercados de Curitiba (Figura 1C).

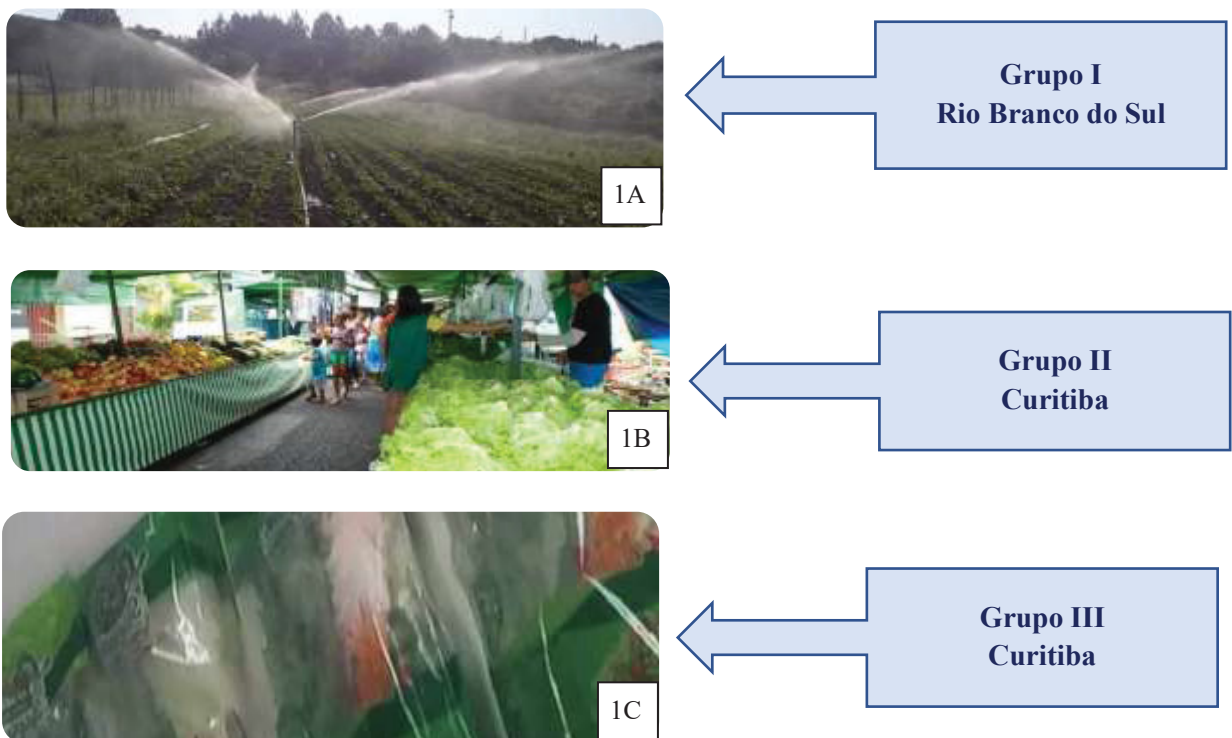
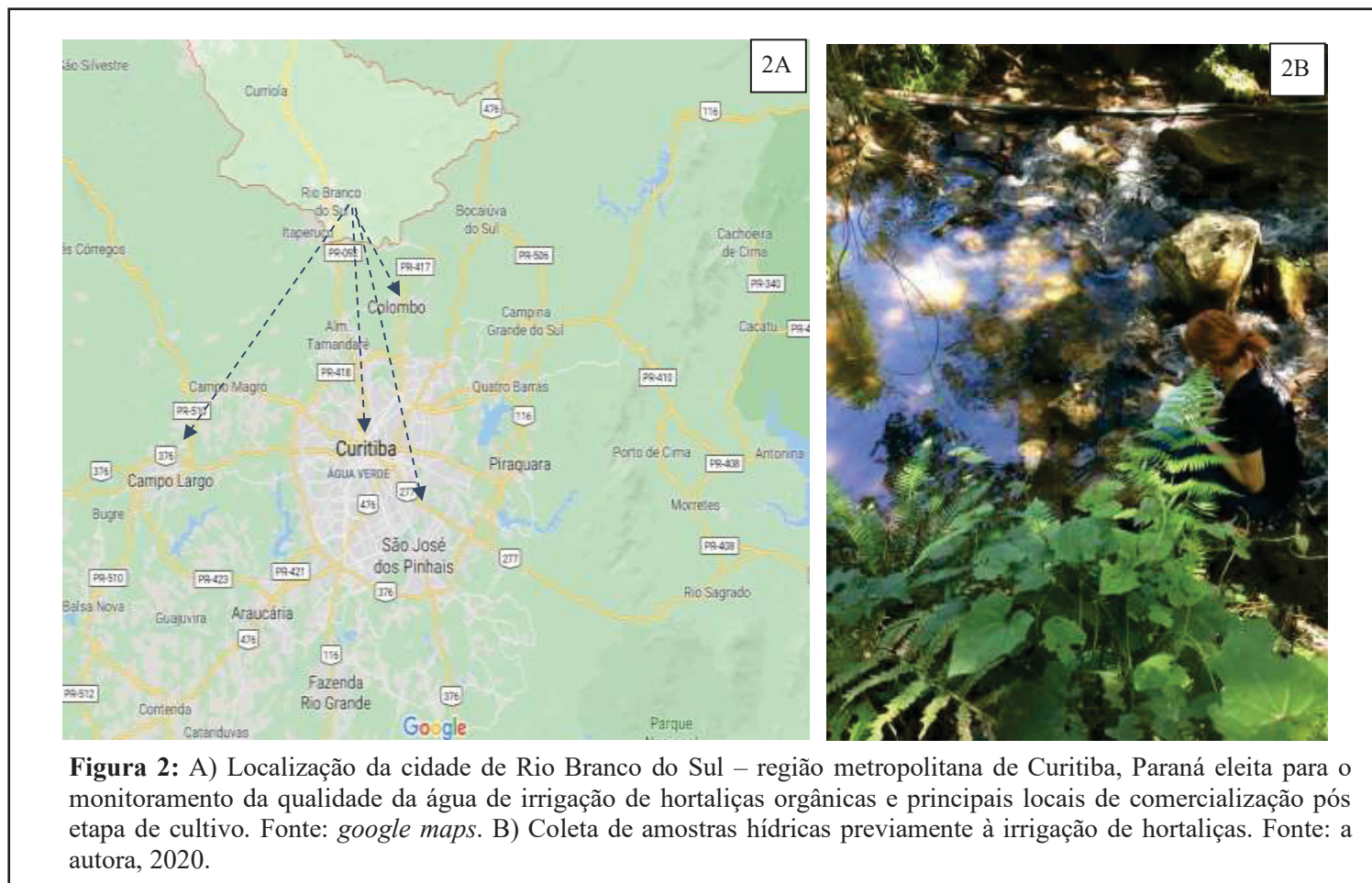


Figura 1: Grupos de amostragem relativo à cadeia produtiva de hortaliças para o monitoramento de parasitos e indicadores bacteriológicos.

4.2 Grupo I - Coleta e análise de amostras hídricas destinadas à irrigação e lavagem de hortaliças (etapa de cultivo).

As coletas de amostras hídricas foram realizadas na cidade de Rio Branco do Sul, região metropolitana de Curitiba (Figura 2 A e B) que está inserida na bacia hidrográfica do rio Capivari, um dos principais cursos de água que banham o estado do Paraná.



Para este grupo, foram coletadas amostras de água mensalmente de outubro de 2019 a fevereiro de 2020, utilizadas para a irrigação de 10 propriedades certificadas para produção de hortaliças orgânicas e de lavagem de vegetais (Figura 3) como segue: ponto 1: água bruta de rio antes da reservação (ambiente lótico); ponto 2: água bruta de rio armazenada para captação (ambiente lêntico); ponto 3: água de irrigação de hortaliças do tipo aspersão.

A água que irriga hortaliças advém do ponto 2, sendo succionada por uma bomba e encaminhada para canos de PVC e liberada por aspersão (Ponto 3); e ponto 4: água de lavagem dos vegetais.

Para a pesquisa de *Giardia* spp., e *Cryptosporidium* spp., foram coletados volumes de 10L de água de rio (água bruta utilizada para irrigação) dos pontos um, dois e três. Para a pesquisa dos mesmos protozoários supramencionados e de outros protozoários e helmintos intestinais, um volume total de 10L de água, foi coletado somente após a lavagem de hortaliças (ponto 4), oriunda de poço artesiano.

Todas as amostras foram coletadas em galões previamente tratados com solução surfactante de eluição Tween 80 (0,1%), para evitar a adesão de cistos, oocistos e eventuais ovos de helmintos presentes nas amostras. Para todos os quatro pontos de água, também foi realizada a coleta de amostras hídricas para a pesquisa de bactérias indicadoras – *E. coli* e *Enterococcus* sp., em frascos com capacidade de 250mL previamente autoclavados e tratados com reagente quelante, conforme preconização do *Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2017).

Além disso, no decorrer dos meses de amostragem, também foram coletadas amostras de água dos poços artesianos para verificação de sua qualidade microbiológica, utilizada para dessedentação dos produtores rurais e de seus animais domésticos.

Todos os galões e os frascos foram devidamente identificados de acordo com o ponto amostral, e as amostras acondicionadas em caixas isotérmicas, mantidas refrigeradas e transportadas para o Laboratório de Parasitologia Ambiental, da Universidade Federal do Paraná para pesquisa de parasitos e, enviadas por Sedex® 10 para o Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN), unidade de fronteira em Foz do Iguaçu - parceiro no presente estudo, para a pesquisa de bactérias indicadoras.

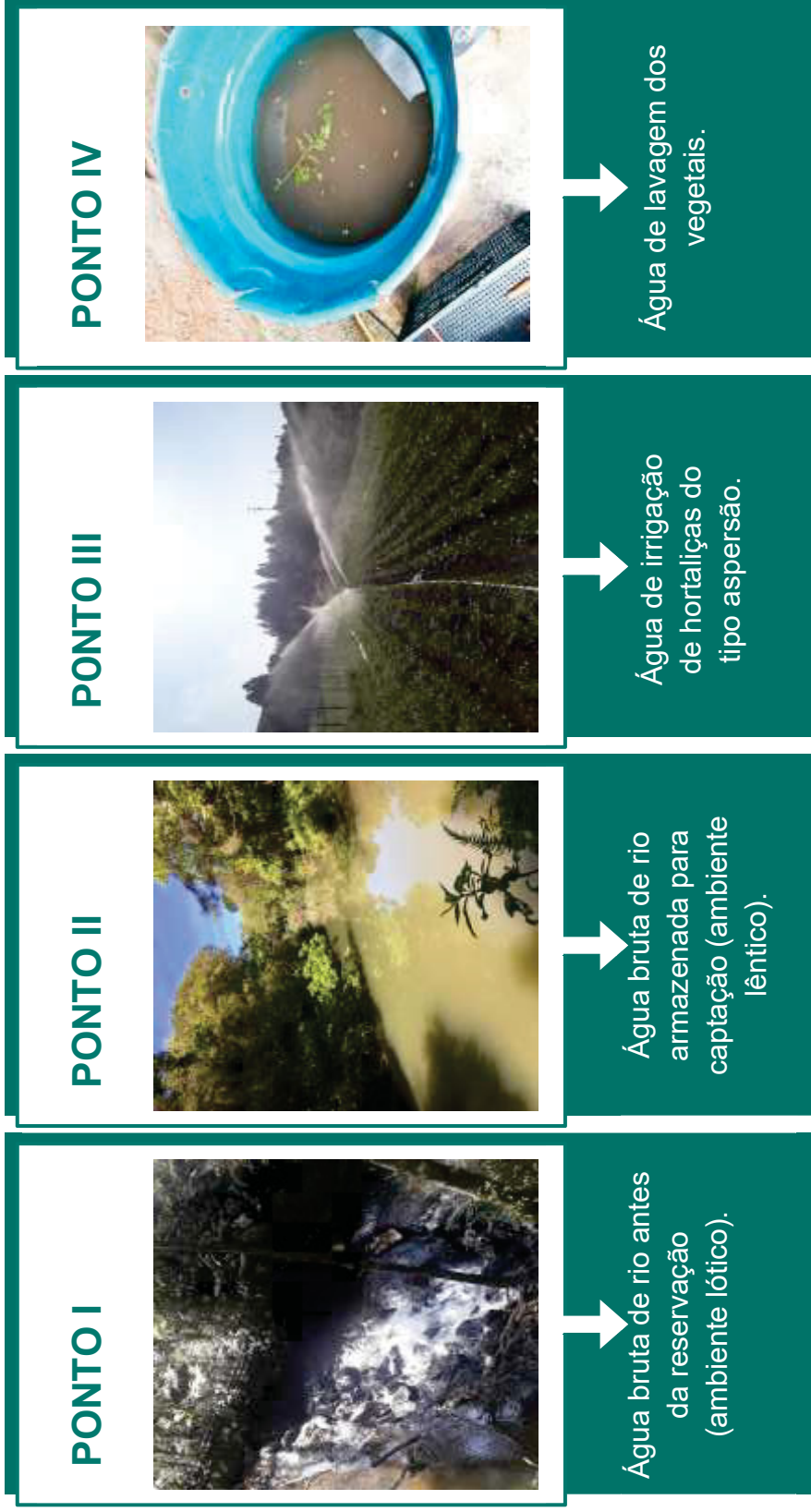


Figura 3: Pontos de amostragem referente à água de irrigação utilizada para o cultivo de hortaliças orgânicas e lavagem de vegetais no município de Rio Branco do Sul, região metropolitana de Curitiba.

4.2.1 Processamento das amostras hídricas.

4.2.1.1 Pesquisa de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em água de irrigação e lavagem de hortaliças orgânicas.

Todas as amostras dos quatro pontos de água (n = 20) foram processadas pela técnica de filtração em membranas de ésteres mistos de celulose (47 mm de diâmetro, porosidade nominal de 3µm) de acordo com Franco et al., 2001, com modificações na etapa de centrifugação (velocidade e tempo), para adequação à preconização do método 1623.1 da USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) (USEPA, 2012). O sistema de filtração utilizado foi a bomba de vácuo ajustada a um fluxo de 0,4 a 4L / min e porta-filtro Millipore®.

A etapa de eluição dos protozoários foi feita mediante raspagem e lavagem das membranas com solução surfactante (Tween 80, 0,1%) durante 20 minutos. O líquido resultante da etapa de eluição foi transferido para tubos cônicos e concentrado por centrifugação (1500 x g por 15 minutos).

Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi transferido para tubos de microcentrífuga e mantido sob refrigeração à 4°C até a realização da pesquisa de cistos e oocistos por Reação de Imunofluorescência Direta (RID).

4.2.1.2 Visualização dos protozoários por reação de imunofluorescência direta (RID).

As amostras de água utilizadas para irrigação de hortaliças e lavagem dos vegetais foram analisadas por reação de imunofluorescência direta. As lâminas foram confeccionadas a partir do procedimento operacional padronizado de acordo com as instruções do fabricante (Merifluor® Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio) com a

utilização de anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* direcionados aos epítomos da parede dos oocistos e cistos, respectivamente, mediante marcação dos protozoários pelo fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). A confirmação da morfologia dos protozoários foi feita mediante a incorporação do corante vital DAPI e por DIC (microscopia de contraste de interferência diferencial).

As amostras foram submetidas a agitação em vórtex por 2 minutos, e cada tubo foi invertido três vezes após o término da agitação, com a finalidade de distribuir os cistos e oocistos de forma homogênea no micro tubo. Em seguida, foram pipetadas alíquotas de 10µL de cada amostra, sendo cuidadosamente distribuídas nos poços identificados das lâminas de imunofluorescência, as quais foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos para secagem.

Posteriormente, foram acrescentados 10µL de metanol para fixação das amostras, mantidas em repouso por 10 minutos. Em seguida, foi adicionada uma gota do reagente de detecção contendo os anticorpos monoclonais e uma gota de contra corante, sendo as preparações mantidas em câmara úmida e ao abrigo da luz por 30 minutos em placas de Petri.

Para a remoção do excesso dos reagentes foi procedida a etapa de lavagem, utilizando-se solução tampão fosfato (pH 7,5) do kit Merifluor[®] em diluição de (1: 20). Logo após, foram adicionados 20µL de DAPI, e as lâminas foram mantidas em câmara úmida e ao abrigo da luz por 10 minutos. Decorrido o tempo, realizou-se três lavagens com tampão e uma lavagem com água destilada para remoção do excesso do corante vital. Em seguida, as lâminas foram mantidas em câmara de secagem com sílica em uma placa de Petri e após uma hora, acrescentou-se o meio de montagem e uma lamínula em cada lâmina.

A visualização dos cistos e oocistos foi realizada em microscópio de epifluorescência equipado com um filtro de excitação na faixa de 450 a 490 nm e filtro de barreira de 520 nm. A confirmação da morfologia dos protozoários foi feita mediante a incorporação do corante vital DAPI e por DIC (Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial).

Os critérios de positividade adotados foram os preconizados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, de acordo com a versão mais recente do método 1623.1 (USEPA, 2012).

Para oocistos considerou-se: o tamanho (4 - 6 μ m) e o formato (ovoides a esféricos), a presença de sutura e, o grau e intensidade de fluorescência verde-maçã brilhante predominante na parede dos oocistos de maneira uniforme, formando um anel típico. Além dos critérios de fluorescência e morfometria, utilizou-se o filtro de UV para DAPI e observação ou não da incorporação do corante vital sendo classificadas as seguintes características: a) coloração interna azul clara (sem núcleos distintos) e / ou com um aro / borda verde = DAPI - negativo; b) Coloração interna azul intensa e c) até quatro núcleos distintos azuis celestes - DAPI - Positivos.

Os seguintes critérios foram estabelecidos para classificação de oocistos no filtro DIC: a) oocisto de *Cryptosporidium* vazio “empty”; b) oocisto com estrutura amorfa e c) oocisto com estrutura interna (um a quatro esporozoítos / oocisto). A presença de características atípicas tanto internamente quanto na parede dos oocistos, também foi um critério de exclusão de positividade como: poros, um ou dois núcleos grandes preenchendo a célula, dentre outros.

Os critérios de positividade considerados para os cistos foram: tamanho entre 8 – 18 μ m, formato arredondado a ovóide, e grau e intensidade de fluorescência verde-maçã

brilhante predominante na parede dos cistos, de maneira uniforme, em formato anel típico. Os padrões estabelecidos para DAPI foram os mesmos descritos anteriormente. Para o filtro de DIC, quatro características foram observadas e classificadas: a) cisto de *Giardia* vazio “empty”; b) cisto de *Giardia* com estrutura amorfa; c) cisto de *Giardia* com um tipo de estrutura interna (núcleos 1 a 4, bem como sua disposição na célula, axonemas e corpos medianos); d) cisto de *Giardia* com mais de um tipo de estrutura interna. Os mesmos critérios de exclusão mencionados anteriormente foram utilizados para classificação de cistos de *Giardia*.

4.2.1.3. Cálculo da concentração de cistos e oocistos nas amostras hídricas.

A concentração por litro de cistos e oocistos foi estimada de acordo com Franco et al., 2001.

$$X = \frac{n}{K} \times \frac{S}{A} \quad (1)$$

Onde:

X = Concentração de cistos e oocistos/L

n = número de oocistos ou cistos visualizados no poço da lâmina

K = 10 (Volume do sedimento examinado no poço = 10µL)

S = Volume total do sedimento obtido (µL)

A = Volume filtrado da amostra

4.2.1.4 Caracterização molecular de *Giardia* spp.

Todas as amostras consideradas positivas para *Giardia* spp. por RID foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit DNA ZR Fungal / Bacterial DNA (Zymo Research®). A extração foi feita seguindo-se as recomendações do fabricante e o DNA resultante ao final do processo foi eluído em 100µL da solução DNA Elution Buffer® e armazenado e conservado sob refrigeração a - 20°C.

Em seguida, reações de *nested* PCR foram efetuadas para a detecção molecular do protozoário, sendo que para *Giardia duodenalis* quatro marcadores moleculares foram utilizados: triose fosfato isomerase (*TPI*), conforme descrito por Sulaiman e colaboradores (2003), β -*giardina* (*BG*) (Cacciò et al., 2002 e Lalle et al., 2005), menor subunidade de RNA ribossomal (*SSU rRNA*) (Hopkins et al, 1997; Appelbee et al., 2003), e glutamato desidrogenase (*GDH*) (Cacciò et al., 2008 e Lalle et al., 2009)

4.2.1.5 Amplificação de DNA por *Nested-PCR*

Para a primeira reação de amplificação do gene *TPI* foram utilizados iniciadores externos, *AL3543*- 5'-AAATIATGCCTGCTCGTCG – 3' e o *AL3546*- 5'-CAAACCTTI TCCGCAAACC-3' amplificando um fragmento de 605 pares de base (pb).

A segunda reação de PCR utilizou iniciadores internos para amplificar um fragmento de 530 pb: *AL3544*- 5'-CCCTTCATCGGGGTAACCTT-3' e *AL3545*- 5'-GTG GCCACCACICCCGTGCC-3'.

Para ambas as reações foram feitas réplicas com volume final de 25µL cada, contendo: 4,5µL de água, 12,5µL de GoTaq[®], Colorless Master Mix, 1,5µL de cada iniciador, 2,0µL de BSA (0,1g/10mL) e 3µL de DNA.

As reações foram incubadas em termociclador (Applied Biosystems[®]) com as seguintes condições: ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e, extensão final no último ciclo a 72°C por 10 minutos para ambas as reações. Após a reação as amostras foram mantidas a 4°C no termociclador até serem retiradas.

Para amplificação do gene *β-giardina (BG)*, na primeira reação foram utilizados os iniciadores externos: *G7*: 5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC- 3' e o *G759*: 5' -GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC- 3' amplificando um fragmento de 753 pares de base.

Para a segunda reação utilizou-se os iniciadores internos para amplificação de um fragmento de 511pb: (*Forward Lalle 1*) 5'-GAACGAGATCGAGGTCCG- 3' e *Reverse Lalle 2* - 5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT- 3'.

Para ambas as reações foram feitas réplicas com volume final de 50µL cada, contendo: tampão de PCR 1x, 15 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5µL e BSA (0,1g/10mL), 1µM de cada iniciador, 2,5U de Taq Polimerase e 5µL de DNA.

As reações foram submetidas às seguintes condições para amplificação: ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos na primeira reação e a 55°C na segunda, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos para ambas as reações.

O gene glutamato desidrogenase (*GD*) foi amplificado mediante utilização dos iniciadores externos na primeira reação: Gdh1: 5'-TTCCGTRTYCAGTACAACCTC-3' e o primer Gdh2: 5'-ACCTCGTTCTGRGTGGCGCA-3', para amplificação de um fragmento de 754pb. Para a segunda reação foram utilizados os iniciadores internos para amplificação de um fragmento de 530pb: Gdh3: 5'-ATGACYGAGCTYCAGAGGCACGT-3' e o primer Gdh4: 5'-GTGGCGCARGGCATGATGCA-3'.

Para ambas as reações foram confeccionadas réplicas com volume final de 50µL cada, contendo: 25µL de GO Taq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) 2x, 1µM de cada iniciador (10pmol/µL), 5,0µL de DNA e 18µL de água ultrapura autoclavada.

As reações foram submetidas ao ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e por fim, extensão final a 72°C por 7 minutos, para ambas as reações.

Para o gene *SSU rRNA*, na primeira reação foram utilizados os iniciadores externos *GiaF*: 5'-AAGTGTGGTGCAGACGGACTC-3' e *GiaR*: 5'-CTGCTGCCGTCCTTGGATGT-3', amplificando um fragmento de 497pb. Para a segunda reação foram utilizados os iniciadores: *RH-11*: 5'-CATCCGGTCGATCCTGCC-3' e *RH-4*: 5'-AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG-3', para amplificação de um fragmento de 292 pb.

Para a primeira e segunda reação foram feitas réplicas com volume final de 50µL cada, contendo: Tampão de PCR 1x, 2mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, DMSO 5%, 1 µM de cada iniciador, 0,5U de Taq Polimerase e 5µL de DNA.

As reações foram submetidas às seguintes condições para amplificação: ciclo de desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 45

segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos na primeira reação e a 55°C na segunda, extensão a 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 4 minutos para ambas as reações.

Posteriormente, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (AVATI) 2% em tampão TAE com GelRed® (Biotium) (5µL/60mL). O tamanho do fragmento foi estimado por comparação com o marcador de peso molecular (100bp Plus DNA Ladder Invitrogen™). O gel foi visualizado em fonte de luz ultravioleta de 302 nm em iluminador e fotodocumentador.

Nas amostras em que o fragmento de interesse foi amplificado, procedeu-se a purificação de cada um dos produtos utilizando o kit ExoSAP -IT® PCR Product Cleanup, e encaminhadas para o sequenciamento. As sequências foram analisadas e alinhadas e submetidas ao sistema BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*) para comparação com sequências homólogas disponíveis de *Giardia* no banco de dados GenBank (NCBI).

O alinhamento das sequências dos fragmentos amplificados foi realizado utilizando o programa Clustal W e Bioedit Sequence Alignment Editor.

Para as análises filogenéticas, utilizou-se o programa Mega software versão X (Kumar et al., 2018) inferido pelo método Neighbour Joining (Saitou e Nei, 1987), com *bootstrap* de 2000 réplicas (Felsenstein, 1985) mediante análise de 16 sequências de nucleotídeos e um total de 425 posições no conjunto de dados final, usando a distância calculada pelo modelo Kimura de 2 parâmetros (Kimura, 1980).

4.2.1.6 Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp.

Os ensaios de biologia molecular foram realizados em parceria com o Laboratório de Parasitologia e Biologia Molecular da Companhia Ambiental do estado de São Paulo (CETESB).

Todas as amostras consideradas positivas para *Cryptosporidium* spp. nas leituras de RID foram submetidas à extração de DNA genômico. Para tanto, a extração foi realizada através de três ciclos de lise mecânica com aquecimento a 95°C por 5 min e congelamento a -80°C por 1 minuto conforme protocolo adaptado de Cacciò et al. (2012) e seguida da utilização de *kit* comercial DNeasy PowerSoil® (Qiagen, Germany) conforme as instruções do fabricante.

Após a extração, o DNA obtido das amostras foi mantido em freezer a -20°C, até o momento da realização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a detecção molecular do protozoário dois ensaios (protocolos) foram utilizados para amplificação do gene da região *18S rRNA* comum a todas as espécies de *Cryptosporidium* conforme descrito por Xiao et al. (1999) e Silva et al. (2013).

Os iniciadores, sequência e tamanho de cada fragmento amplificado na primeira e segunda reação estão demonstrados no Quadro 1.

Quadro 1: Lista de iniciadores utilizados para amplificação do fragmento *18S rRNA* de *Cryptosporidium* spp.

Número do ensaio de <i>Nested-PCR</i>	Primers	Sequência	Fragmento	Referência
Primeiro ensaio	SSU F	5'- TCTAGAGCTAATACATGCG - 3'	1325pb	Xiao et al., 1999
	SSU R	5'- CCCATTTCTTCGAAACAGGA - 3'		
	826 F	5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG -3'	826 pb	
	826 R	5'- AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA - 3'		
Segundo ensaio	SHP1	5'- ACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTAT - 3'	773pb	Silva et al., 2013
	SHP2	5'- TTCTCATAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG - 3'		
	SHP3	5'-ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACA - 3'	611pb	
	SSU-R3	5'- AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA- 3'		

Para ambos os ensaios, foram utilizados 5µL de DNA de cada amostra, em volume final de 25µL de solução *master mix*, contendo: 12,5 µl de água ultrapura, 5µl de tampão 5X (contendo 1,5 mM de MgCl₂) 0,5mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 µM de cada iniciador (Exxtend[®] do Brasil) e 1,25U de GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega).

A segunda reação (*Nested*) foi realizada a partir de três réplicas de cada amostra com 2µl dos produtos amplificados da primeira reação por tubo (Araujo et al., 2011). Para esta reação foi utilizada uma mistura de PCR (“*master mix*”) com volume final de 25µl contendo, água ultrapura, 5µl de tampão 5X (contendo 1,5 mM de MgCl₂), 0,5mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 µM de cada iniciador, 1,25 U de GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega).

As reações utilizando os iniciadores de Xiao et al. (1999) foram submetidas a um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de 39 ciclos de amplificação compostos de desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 60°C por 45 segundos;

extensão a 72°C por 90 segundos; e um ciclo para extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a reação, as amostras foram mantidas a 4°C até serem retiradas do termociclador.

As reações utilizando os iniciadores de Silva et al (2013) foram submetidas a um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos seguida de 39 ciclos de amplificação compostos de desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 56°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 60 segundos; e um ciclo para extensão final a 72°C por 7 minutos. A segunda reação de amplificação foi realizada nas mesmas condições da primeira.

A cada tubo contendo o produto amplificado foi adicionado 5µl de tampão carreador de amostra 6X (Invitrogen™) e 10µl desta mistura foi aplicado em cada poço do gel de agarose 1,5% (Amersham Biosciences®) corado com 0,5µl de GelRed® (Biotium) imerso em Tampão Tris – Borato - EDTA (TBE) 1X. O tamanho do fragmento foi estimado por comparação com o marcador de peso molecular (100bp Plus DNA Ladder Invitrogen™).

O gel foi visualizado em fonte de luz ultravioleta de 302 nm em transiluminador e fotodocumentador. A imagem foi capturada através do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e o software Labworks (UVP).

4.2.1.7 Pesquisa de outros parasitos em água de lavagem dos vegetais.

Para a pesquisa de ovos de helmintos e cistos de outros protozoários intestinais, mensalmente foram utilizados 2L de cada amostra coletada somente após a lavagem de diferentes vegetais orgânicos (cenoura, beterraba, alface, tomate e rabanete) produzidos em Rio Branco do Sul.

Este volume foi dividido em tubos *Falcon* com capacidade para 50mL, sendo estes submetidos a diversas centrifugações a 1500 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi

descartado e o sedimento final de cada amostra (2mL) transferido para microtubos com capacidade para 2mL.

Todo o sedimento foi analisado mediante visualização em microscopia óptica com emprego de lugol aproximadamente 40 lâminas / amostra.

4.2.1.8 Análises microbiológicas e físico-químicas

A pesquisa de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. foi realizada em todas as amostras hídricas mensalmente dos quatro pontos eleitos (n = 20) e, em água de poço artesiano em quatro ocasiões durante o estudo.

As análises bacteriológicas quanto aos indicadores de contaminação fecal - *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp., foi realizada através do método do substrato definido (Colilert® e Enterolert® - Idexx, Laboratories, Inc., Maine USA) de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA/AWWA/WEF, 2017).

Os resultados são definidos em padrão NMP (número mais provável) / 100mL, onde são utilizadas 97 cavidades em uma cartela estéril, sendo os resultados expressos e calculados através de uma tabela padrão pela combinação de cavidades positivas.

O volume de 100mL de cada amostra foi aspirado com uma proveta graduada sendo então adicionado o meio Colilert®.

Após a diluição do meio a amostra foi transferida para uma cartela estéril, sendo esta selada e incubada em estufa bacteriológica à temperatura de 35°C por 24 horas. Em seguida, os poços que apresentaram coloração amarelada foram contados indicando contaminação por coliformes totais.

Posteriormente, a contaminação e concentração de *E. coli* foi aferida pela contagem de poços positivos que exibiram fluorescência sob luz UV, decorrentes do metabolismo de MUG pela enzima β -D-glucuronidase.

Para quantificação do número mais provável de *Enterococcus* sp. seguiram-se as etapas anteriormente descritas, com adição do meio de cultura Enterolert[®] à amostra, e incubação da cartela a 41° C por 24 horas.

Após esse período, a presença das bactérias pesquisadas foi indicada pela degradação do nutriente indicador do Enterolert[®] (4-metilumbeliferona-D-Glucosida) pela enzima β -D-glucosidase, sendo também verificado o número de poços positivos sob luz UV e estimativa do número mais provável.

As análises físico-químicas das diferentes amostras hídricas foram aferidas no Laboratório de Parasitologia Ambiental da Universidade Federal do Paraná com auxílio de aparelho multisensor para mensuração de pH (Mpa-210[®]) e turbidímetro – TD 300[®].

4.3 Grupo II - Análise da contaminação ambiental de alface (*Lactuca sativa*) por parasitos: etapa de comercialização (feiras-livres).

Para a investigação da ocorrência natural de ovos de helmintos e (oo)cistos de outros protozoários intestinais em hortaliças orgânicas de feiras livres (Grupo II) provenientes da região de cultivo (Grupo I) devidamente certificadas, foi estabelecida como unidade amostral um pé ou cabeça de alface, de qualquer peso ou tamanho, adotando-se como critério que cada amostra apresentasse boa qualidade visual: folhas íntegras e bom estado de conservação.

Foram coletadas amostras do vegetal em três diferentes pontos da cidade de Curitiba, sendo estes: Jardim das Américas, Cabral e Centro. Um total de 55 amostras foi analisado, sendo: 18 amostras da feira localizada no bairro Cabral, 14 amostras do bairro Jardim das Américas e 23 amostras oriundas da região central da cidade de Curitiba.

Os vegetais foram escolhidos de forma que a unidade amostral fosse retirada inteira do lote à venda. As amostras foram então acondicionadas em saco plástico sem uso prévio e levadas ao Laboratório de Parasitologia Ambiental da Universidade Federal do Paraná, e as análises foram realizadas no mesmo dia da coleta. Para cada amostra foram analisados 30g do vegetal.

A pesquisa de parasitos intestinais nas amostras de alfaces orgânicas nos três pontos supramencionados, foi realizada somente após a avaliação da eficiência de recuperação da técnica para detecção de ovos de helmintos padronizada por Matosinhos et al. (2016), e avaliada inter laboratorialmente mediante ensaios de contaminação artificial, com número conhecido de ovos de *Ascaris* sp. por 10 diferentes centros de pesquisa / universidades com experiência prévia em análise de alimentos (Pineda et al., 2021) (Anexo I). Ressalta-se que a mesma metodologia também permite a detecção concomitante de cistos de protozoários intestinais.

4.4 Avaliação da qualidade microbiológica e parasitológica de hortaliças frescas, *in natura*, preparadas (sanificadas, fracionadas e refrigeradas) prontas para o consumo (Grupo III).

Para este grupo, foi analisada a contaminação de vegetais minimamente processados por ovos de helmintos, cistos e oocistos de *Giardia* e *Cryptosporidium*, respectivamente e, outros protozoários intestinais eventualmente presentes nas amostras.

Visto que este tipo de alimento apresenta um processamento prévio de higienização pela indústria alimentícia e para obtenção de um desenho amostral representativo, as amostras deste grupo foram analisadas em *pools* (n = 10 pacotes de 100g/ *pool*), oriundos de dois diferentes produtores, denominados I, II (Tabela 4).

Entre o período de outubro de 2019 a fevereiro de 2021, 200 pacotes de vegetais prontos para consumo foram adquiridos em mercados regionais de ambos os produtores. Todas as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas e transferidas para o laboratório de Parasitologia Ambiental da UFPR para análise.

Tabela 4: Número de *pool* amostrais analisados de minimamente processados oriundos de dois produtores adquiridos em supermercados de Curitiba.

Produtor / marca	Tipo de vegetal	Nº amostras/ <i>pool</i>	Nº total de <i>pools</i>	Nº total de amostras
I	Alface variedade crespa, cenoura, agrião	10	11	110
II	Alface variedade crespa	10	9	90
Total		10	20	200

As análises foram conduzidas conforme descrito por Cook et al., (2007) e Caradonna et al., (2017), com modificações. Para cada 10 pacotes de vegetais minimamente processados (frescos, selecionados e prontos para consumo), 100g foram pesados em balança semi-analítica e adicionados a sacos plásticos limpos. Previamente à pesagem das amostras, foi realizada a avaliação sensorial (cor, odor, aparência e textura) de cada pacote.

Para cada amostra referente ao *pool*, foram adicionados 200mL de solução de glicina 1M, pH 5,5 aos sacos plásticos, sendo mantidos em repouso por 30 min com a solução. Decorrido este tempo, cada saco foi agitado vigorosamente por 3 minutos.

Após o procedimento, o líquido resultante da lavagem dos dez sacos contendo as amostras ($n = 2L$ de glicina / *pool*) foi coletado e transferido para 40 tubos *Falcon* de 50 mL submetidos a sucessivas centrifugações a 1500 x g por 15 minutos.

Os sobrenadantes foram então descartados e os sedimentos de cada tubo foram ressuspendidos em 1mL de água destilada, sendo então reunidos em um único tubo.

O tubo foi então novamente centrifugado nas mesmas condições e o sobrenadante descartado. O sedimento foi dividido em duas alíquotas e transferido para dois microtubos com capacidade para 2mL, sendo estes utilizados nas análises microscópicas e moleculares.

Para a pesquisa de ovos de helmintos e cistos de protozoários intestinais foram feitas lâminas de todo o sedimento restante no tubo (cerca de 2mL) para identificação das estruturas parasitárias de acordo com o item 4.3.1. A leitura das amostras foi realizada em microscópio óptico de luz branca em aumento de 400x, utilizando-se lugol.

O restante do sedimento (2mL) foi utilizado para a pesquisa de *Giardia* e *Cryptosporidium*, por reação de imunofluorescência direta (RID) de acordo com o item 4.2.1.2, entretanto, para este grupo, foram lidos dois poços (20µl cada) para cada amostra para atestar a presença ou ausência dos mesmos.

A partir do mesmo sedimento, 300µL foram pipetados para extração de DNA e caracterização molecular de cistos e oocistos nas amostras consideradas positivas por RID, conforme descrito no item 4.2.1.4 e 4.2.1.6 para *Giardia* e *Cryptosporidium*, respectivamente.

Para o grupo III, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada também como ferramenta de detecção e confirmação da contaminação por *Giardia duodenalis* em todos os *pools* de amostras oriundas dos produtores I e II em paralelo a RID.

Para cada *pool* de amostra de vegetais prontos para o consumo de ambos os produtores, uma nova amostra do mesmo lote e data de validade, foi adquirida para análise microbiológica como segue: 30g de vegetais foram pesados e colocados em saco plástico de primeiro uso, sendo adicionado 100mL de água peptonada para lavagem das folhas.

O líquido resultante da lavagem foi utilizado para a pesquisa de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp., realizada seguindo a mesma metodologia descrita no item 4.2.3, sendo os valores comparados com a tabela padrão e expressos em NMP/100 mL.

4.5 Interpretação dos resultados da qualidade sanitária dos vegetais.

Após as análises, tanto as amostras do grupo II (hortaliças *in natura* comercializadas em feiras livres), quanto os vegetais minimamente processados prontos para o consumo (grupo III), foram classificados como próprios para o consumo (P) quando todos os critérios estiveram em acordo com os padrões estabelecidos pelas legislações vigentes, ou impróprios (I), quando em desacordo (Tabela 5).

Tabela 5: Critérios utilizados para avaliação da qualidade sanitária dos vegetais *in natura* ou prontos para o consumo de acordo com as preconizações de legislações vigentes no Brasil.

Grupo II e III ⁺			Grupo III ⁺⁺		
RDC n°14/ 2014			Instrução normativa 60 (Brasil, 2019)		
Limite máximo tolerável					
Ovos / larvas de helmintos	Cistos / oocistos	Alimentos deteriorados* (características sensoriais).	Artrópodes / fragmentos	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.***
Ausência	Ausência	Ausente	Não se aplica**	Até 10²	Ausente

⁺Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências

⁺⁺ Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos

* Alteração da cor e presença de odor

** Limite máximo permitido para diferentes alimentos n= 10; limite não estabelecido para vegetais

*** Análises complementares realizadas por procedimento operacional padronizado pelo Lacen

5. RESULTADOS

5.1 Monitoramento da qualidade microbiológica e parasitológica da água utilizada para o cultivo de hortaliças orgânicas no município de Rio Branco do Sul (Grupo I).

5.1.1 Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em água de irrigação e de lavagem de hortaliças.

O monitoramento de ambos os protozoários patogênicos foi conduzido em três diferentes pontos de água relacionados à irrigação de cultivo de hortaliças - P1, P2 e P3 (n = 15 amostras), e em amostras de água de lavagem (n = 5 amostras), dentre as quais a contaminação por pelo menos um gênero de protozoário foi detectada em 20% das amostras (n = 4 / 20) (Tabela 5) (Prancha 1).

Nas águas do rio Capivari, em ponto de coleta de ambiente lótico (P1), oocistos de *Cryptosporidium* spp., foram detectados em 20% das amostras, em concentração de 29,6 oocistos/L, não sendo detectados nos demais pontos relacionados à água utilizada para irrigação de hortaliças (P2 – ambiente lêntico) e (P3 – aspersão).

A contaminação por cistos de *Giardia* spp., foi evidenciada nas águas do ambiente lêntico (P2), (n = 1 amostra) em concentração de 30,1 cistos/L, não sendo detectados nos demais pontos de água (P1 e P3) relacionados à irrigação dos vegetais orgânicos.

Com relação às etapas de cultivo de hortaliças orgânicas - irrigação e lavagem - as maiores taxas de contaminação (40% das amostras positivas) e concentração dos protozoários pesquisados, foram verificadas na etapa final que precede a comercialização

em feiras livres, após a lavagem dos vegetais (P4) - concentrações de 78,6 oocistos/L e 32,2 cistos/L, respectivamente.

Para as amostras positivas, no máximo dois (oo)cistos foram visualizados em cada poço das lâminas de imunofluorescência. As formas parasitárias confirmadas por RID, não apresentaram estruturas atípicas nos filtros de DAPI e DIC, como poros, invaginações, apêndices etc. e foram classificadas como DAPI negativo e sem estruturas internas, classificadas como “*empty*” no filtro de DIC, de acordo com os critérios da USEPA – método 1623.1 (Tabela 6).

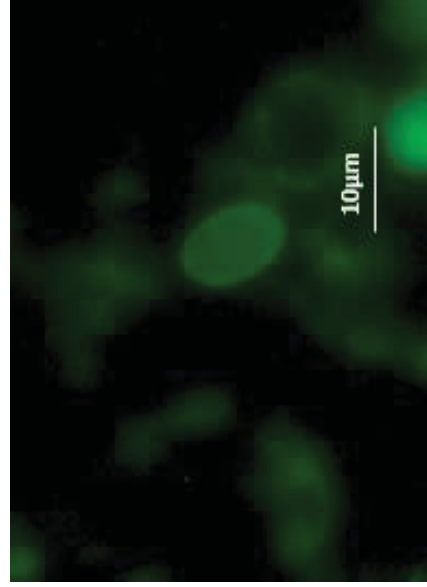
Nos ensaios de PCR, referente ao total de amostras positivas por RID, não se observou amplificação de DNA para ambos os protozoários.

Tabela 6: monitoramento da contaminação por cistos de *Giardia* spp., e oocistos de *Cryptosporidium* spp., em diferentes amostras utilizadas para irrigação e lavagem de hortaliças orgânicas em Rio Branco do Sul mediante adoção de critérios estipulados pela USEPA.

Mês / ano	Ponto 1: Ambiente lótico			Ponto 2: Ambiente fêntico			Ponto 3: Irrigação por aspersão			Ponto 4: lavagem dos vegetais		
	RID	DAPI	DIC	RID	DAPI	DIC	RID	DAPI	DIC	RID	DAPI	DIC
Outubro / 2019	(+)	(a)*	(a)**	ND	NA	NA	ND	NA	NA	(+)	(a)*	(a)**
	<i>Crypto</i>											
Novembro / 2019	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA
Dezembro / 2019	ND	NA	NA	(+)	(a)*	(a)**	ND	NA	NA	(+)	(a)*	(a)**
	<i>Giardia</i>											
Janeiro / 2020	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA
Fevereiro / 2020	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA

(+) Positivo na RID – tamanho e formato compatíveis / fluorescência verde maçã brilhante – sem estruturas atípicas em DAPI e DIC.

(a)* DAPI negativo - Coloração azul clara, sem núcleos distintos; (a)**DIC (oo)cisto “empty”; ND = não detectado; NA = não se aplica.



Prancha 1: Oocisto de *Cryptosporidium* spp. e cisto de *Giardia* spp., detectados em água utilizada para irrigação e lavagem de hortaliças orgânicas.
Legenda: A = RID; B = DAPI; C = DIC. Aumento: 400 x.

5.1.2 Ocorrência de ovos ou larvas de helmintos e outros protozoários intestinais na água de lavagem de hortaliças orgânicas.

O monitoramento da ocorrência natural de parasitos foi realizado após a lavagem das hortaliças realizada pelos produtores com água de poço artesiano. A contaminação por pelo menos uma forma parasitária foi detectada em todas as amostras.

Larvas de nematódeos foram evidenciadas em 80% das amostras analisadas. A contaminação por cistos de *Balantioides coli* foi detectada em 40% das amostras nos meses de outubro e dezembro de 2019, com frequência de seis e um cisto, respectivamente (Figura 4).



Figura 4: Cisto de *Balantioides coli* detectado em água de lavagem de hortaliças cultivadas em Rio Branco do Sul, Paraná. A seta evidencia a presença de macronúcleo. Aumento: 400X

5.1.3 Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química da água destinada a irrigação e lavagem de hortaliças orgânicas.

Os indicadores microbiológicos de contaminação fecal e a presença de coliformes totais foram detectados em diferentes concentrações em todas as amostras hídricas (Tabela 6). Quando considerados os valores de *E. coli*, a água utilizada para irrigação de hortaliças apresentou boa qualidade microbiológica. Entre todos os pontos de amostras hídricas, a água utilizada para lavagem dos vegetais apresentou melhor qualidade microbiológica para este indicador, inclusive com menor média no período de análise (Tabela 6).

Entretanto, ao analisar a contaminação por *Enterococcus* sp., as densidades médias de contaminação foram superiores, demonstrando maior impacto de contaminação fecal. As maiores médias de contaminação foram identificadas nos pontos 1 e 2. Em relação ao ponto 1, nas amostras positivas com valores acima de < 1.0 NMP/ 100mL, evidenciou-se a menor contaminação pelo indicador no mês outubro / 2019, no entanto, oocistos de *Cryptosporidium* spp., foram detectados.

Em adição, em dezembro de 2019, a água do ambiente lântico (P2) apresentou excelente qualidade microbiológica para enterococos - < 1.0 NMP/ 100mL, contudo, a contaminação por cistos de *Giardia* spp., também foi evidenciada.

Com relação aos fatores físico-químicos, as maiores médias de pH foram observadas no ponto 3 (água de aspersão) e para a turbidez, para o ponto 4 (água de lavagem) (Tabela 7).

Tabela 7: Concentração de bactérias indicadoras expressas em número mais provável (NMP /100mL) e aferição de fatores físico-químicos monitorados durante cinco meses em diferentes pontos de água destinada à irrigação e lavagem de hortaliças na etapa de cultivo (Grupo I), em Rio Branco do Sul.

Coliformes totais												
<i>Escherichia coli</i>												
<i>Enterococcus sp.</i>												
Mês / ano	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
10/2019	1413,6	1299,7	816,4	>2.419,6	26,3	59,0	61,4	8,4	260,3	416,0	658,6	549,3
11/2019	197,1	1217,2	396,8	1986,3	30,4	72,2	51,8	52,5	371,9	727	490,7	195,7
12/2019	1986,3	270,3	467,4	866,4	4,1	5,1	3,1	5,2	<1,0	<1,0	105,6	122,2
01/2020	1732,9	307,6	2419,6	452	51,7	6,1	74,7	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
02/2020	108,5	>2.419,6	214,1	231	35,5	161,4	<1,0	71,7	980	1046	<1,0	<1,0
Média indicadores	1087,6	1102,9	862,8	1191,6	29,6	60,7	38,4	27,7	322,8	438,2	251,3	173,8
pH												
Turbidez (uT)												
Mês / ano	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
10/2019	6,94	7,87	8,06	7,8	3,47	3,77	5,4	6,8	3,47	3,77	5,4	6,8
11/2019	6,21	6,98	7,56	7,02	3,98	4,72	5,56	9,94	3,98	4,72	5,56	9,94
12/2019	5,92	7,86	7,54	6,97	3,02	4,37	3,55	4,32	3,02	4,37	3,55	4,32
01/2020	5,12	5,94	6,23	6,52	9,91	6,84	9,98	3,14	9,91	6,84	9,98	3,14
02/2020	6,02	6,31	6,53	6,54	4,73	7,12	4,98	12,8	4,73	7,12	4,98	12,8
Média	6,04	6,99	7,18	6,97	5,02	5,36	5,89	7,4	5,02	5,36	5,89	7,4

5.1.4 Avaliação da qualidade da água de poço destinada ao consumo humano

Durante os cinco meses de visita à propriedade rural de cultivo de hortaliças orgânicas, a pedido dos produtores, foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas para avaliação da potabilidade da água de poço artesiano, ingerida pela população local e por animais em quatro meses do estudo.

A água utilizada para cozinhar, dessedentação e demais atividades de higiene dos produtores da região de Rio Branco do Sul apresentou boa qualidade microbiológica quando considerados os valores obtidos para *Escherichia coli*. Entretanto, em uma das amostras foi verificada importante concentração de contaminação fecal, ao se mensurar um indicador complementar – gênero *Enterococcus* (Tabela 8).

Tabela 8: Avaliação da qualidade da água destinada ao consumo humano de produtores rurais da região metropolitana de Curitiba, Paraná.

Mês / ano	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	pH	Turbidez
Outubro / 2019	9,1	<1.0	9,5	NR	NR
Novembro / 2019	579,4	1.0	437,1	6,52	3,21
Dezembro / 2019	665,3	<1.0	<1.0	5,98	4,36
Fevereiro / 2020	20,4	<1.0	<1.0	6,33	1,54

NR = não realizado.

5.2. Ocorrência natural de parasitos em alfaces orgânicas comercializadas em feiras-livres de Curitiba (grupo II).

Ao todo, foram analisadas 55 amostras de alfaces orgânicas comercializadas em feiras livres da capital e produzidas em Rio Branco do Sul. A contaminação por parasitos foi identificada em 16,3% das amostras (Tabela 9). Entre as amostras positivas, a contaminação por *Balantioides coli* foi identificada em 44,5% (4 / 9),

seguida da contaminação por ovos de helmintos de diferentes gêneros e oocistos de protozoários intestinais (Figura 5).

Tabela 9: Frequência de formas parasitárias detectadas em hortaliças provenientes de cultivo orgânico na etapa de comercialização (feiras livres) (Grupo II).

Parasitas	Frequência	(%)	Local	
Protozoários	<i>Balantioides coli</i>	4	44,5	Cabral / Jardim das Américas Jardim das Américas
	<i>Isospora</i> spp.	1	11,1	Cabral
Helmintos	<i>Ascaris</i> spp.	1	11,1	Cabral
	Família Ancylostomatidae	1	11,1	Cabral
	<i>Trichuris</i> sp.	1	11,1	Cabral
	<i>Hymenolepis nana</i>	1	11,1	Jardim das Américas
Total =	9	100		

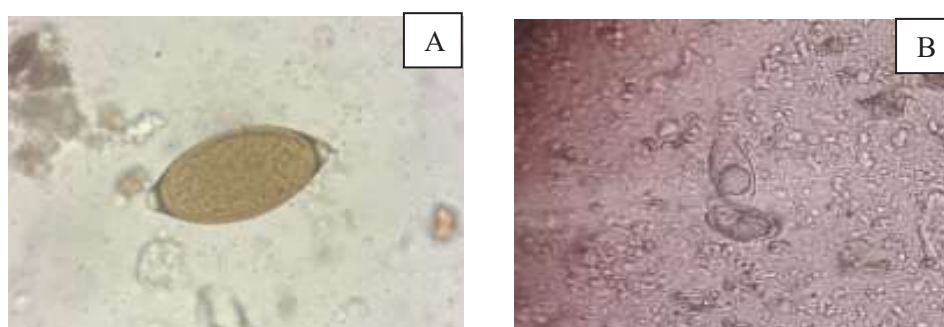


Figura 5: A. Ovo de *Trichuris* spp., B. oocisto de *Isospora* sp. Aumento: 400x.

Larvas de nematódeos foram identificadas em 1,8% das amostras. A presença de artrópodes (inteiros) foi verificada em 7,27% e fragmentos de artrópodes em 12,7% (Tabela 12).

Desta forma, quando considerados os critérios da legislação vigente, um total de 18,1% das amostras de alface orgânica *in natura*, foi considerado impróprio para o consumo humano.

5.3 Monitoramento da ocorrência de parasitos, bactérias e sujidades microscópicas em vegetais minimamente processados destinados ao consumo humano (Grupo III).

5.3.1 Contaminação por oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*

Ao todo, 200 amostras de hortaliças prontas para o consumo de dois produtores (n = 11 pool / produtor I) e (n = 9 pool / produtor II), foram processadas para a pesquisa de *Giardia* e *Cryptosporidium*. Oocistos de *Cryptosporidium* spp., não foram evidenciados por RID em nenhuma amostra de ambos os produtores.

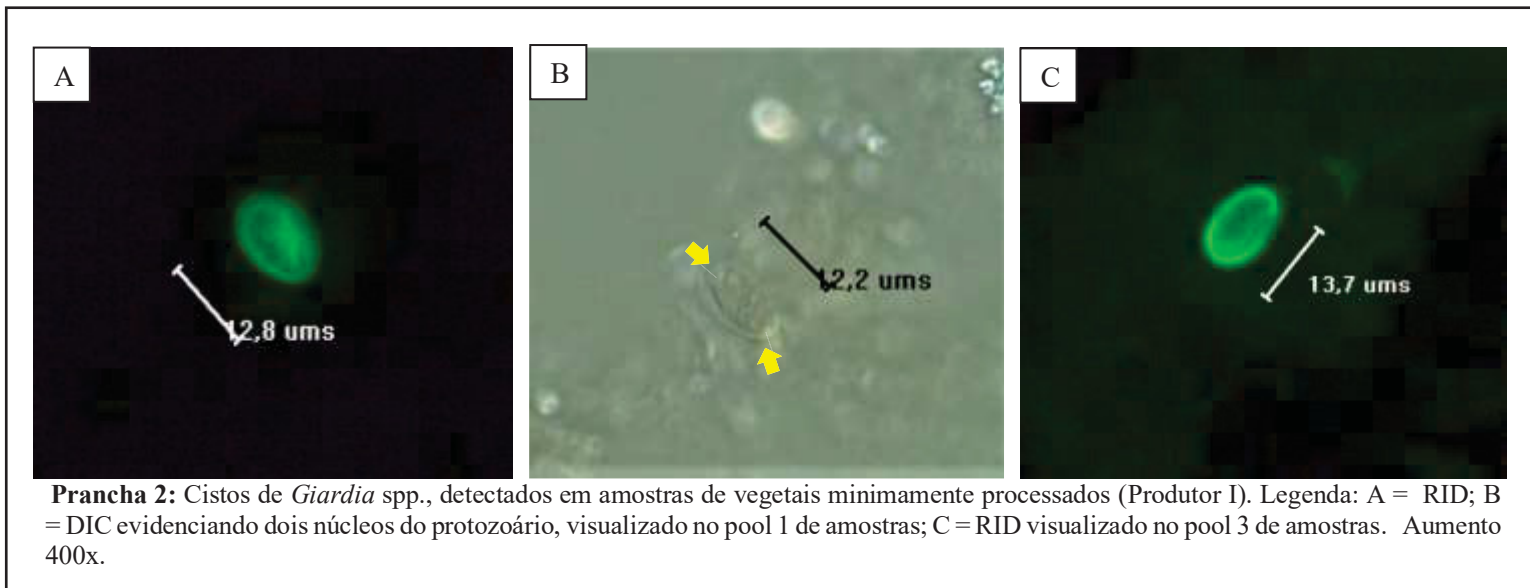
A contaminação por *Giardia* foi detectada em 25% do total de amostras analisadas por diferentes técnicas de detecção (Tabela 10). As maiores taxas de contaminação pelo protozoário foram evidenciadas nos vegetais do produtor I, onde em 36,3% dos pool de amostras (n = 4), o protozoário foi detectado por RID ou PCR.

Tabela 10: Monitoramento da contaminação por *Giardia* em vegetais minimamente processados por reação de imunofluorescência direta (RID) ou por amplificação de diferentes *locus* por reação em cadeia da polimerase (PCR).

<u>Minimamente processado – produtor I</u>						<u>Minimamente processado – produtor II</u>					
Amostra (Pool)	RID <i>Giardia</i> spp.	Marcadores moleculares <i>Giardia duodenalis</i>				Amostra (Pool)	RID <i>Giardia</i> spp.	Marcadores moleculares <i>Giardia duodenalis</i>			
	Cisto(s)	<i>TPI</i>	<i>βG</i>	<i>SSU</i>	<i>GDH</i>		Cisto(s)	<i>TPI</i>	<i>βG</i>	<i>SSU</i>	<i>GDH</i>
1	+	-	-	+	-	1	ND	-	-	-	-
2	ND	+	-	-	-	2	ND	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	3	ND	-	-	-	-
4	ND	-	-	-	-	4	ND	-	-	-	-
5	ND	+	-	-	-	5	ND	-	-	-	-
6	ND	-	-	-	-	6	ND	-	+	-	-
7	ND	-	-	-	-	7	ND	-	-	-	-
8	ND	-	-	-	-	8	ND	-	-	-	-
9	ND	-	-	-	-	9	ND	-	-	-	-
10	ND	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
11	ND	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR

ND = não detectado; + = positivo por RID ou PCR; - = não amplificado; NR = não realizado.

Deste total, cistos de *Giardia* spp., foram visualizados em duas amostras, não apresentando estruturas atípicas nos filtros de DAPI e DIC, sendo consideradas DAPI negativo e, classificadas como cistos contendo um tipo de estrutura interna (núcleos) em DIC, de acordo com os critérios da USEPA (2012) – método 1623.1 (Prancha 2).



A contaminação pelo protozoário foi confirmada tanto por RID como PCR em um *pool* de amostras (Tabela 10), em dois *pool* somente por PCR (Figura 6) e em um *pool* somente por RID (Prancha 2C).

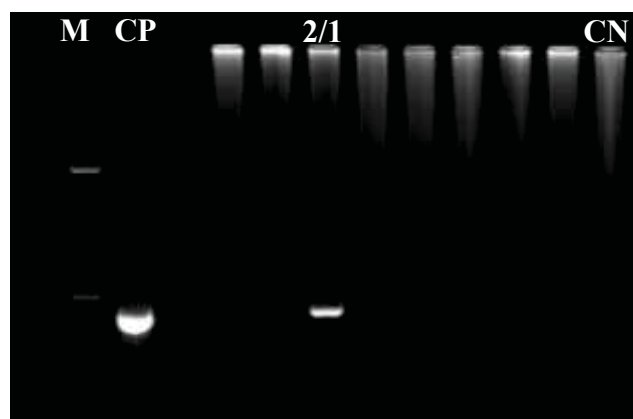


Figura 6: Amostra positiva - *Pool 2* (produtor I) pela amplificação do gene *TPI* (530 pb) para *G. duodenalis* por nested-PCR e eletroforese em gel de agarose 1,5%. M= Marcador molecular; CP: controle positivo. CN: controle negativo.

Dentre as duas amostras positivas do produtor I para o gene *TPI* e submetidas ao sequenciamento, a contaminação por *Giardia duodenalis* foi confirmada, sendo evidenciado o grupo genético B em ambos os *pool*, após comparação com sequências homólogas disponíveis do protozoário no banco de dados GenBank.

A análise filogenética realizada para o gene *TPI* confirmou a contaminação pelo grupo genético B de *G. duodenalis* para ambos os *pool* (n = 2 e 5) do produtor I, revelando homologia com *G. intestinalis* de sequências depositadas no GenBank - número de acesso AY368171 e KT124821 (Figura 10).

Para o gene *SSU rRNA*, não foram obtidas sequências com boa qualidade, inviabilizando a caracterização genotípica.

Ademais, para o produtor II, não foram visualizados cistos de *Giardia* ou oocistos de *Cryptosporidium* spp., nos poços das lâminas de imunofluorescência.

No entanto, uma amostra foi considerada positiva mediante amplificação do gene β -*giardina* (BG) apenas pela PCR, confirmando contaminação por *Giardia duodenalis* em 11,1% das amostras.

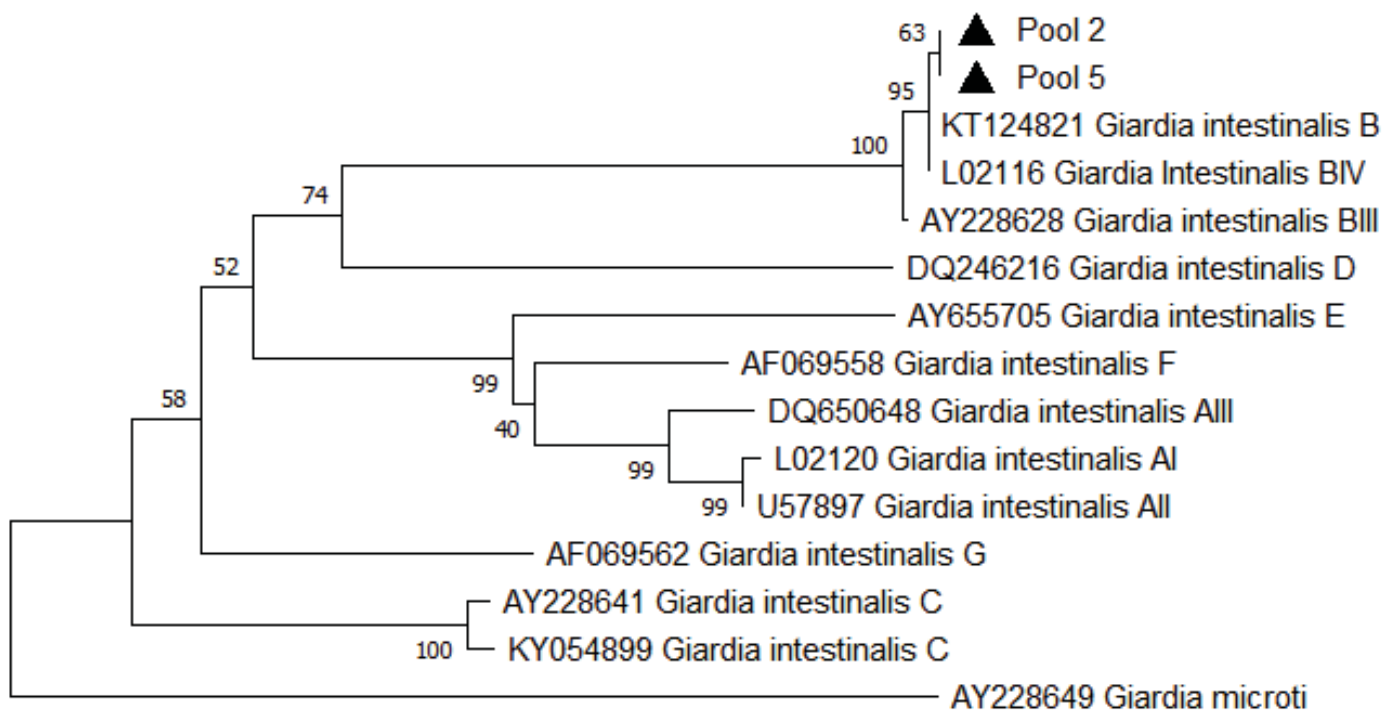


Figura 7: Relação filogenética entre os grupos genéticos de *Giardia duodenalis* no gene *TPI* inferido pelo método Neighbour Joining com bootstrap de 2000 réplicas. Análise conduzida com 16 sequências de nucleotídeos e um total de 425 posições no conjunto de dados final, usando a distância calculada pelo modelo Kimura de 2 parâmetros. As sequências obtidas nesse estudo estão marcadas com triângulo, pelos números designados no laboratório referentes aos isolados do produtor I. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X.

5.3.2 Contaminação por helmintos, (oo) cistos de outros protozoários e sujidades

Nenhum *pool* de amostras de ambos os produtores apresentou contaminação por ovos de helmintos ($n = 20$). A contaminação por cistos de *Iodameba bütschlii* foi detectada mediante visualização por microscopia óptica com uso de lugol, exibindo um índice de contaminação de 9% para ocorrência de estruturas parasitárias.

No que se refere a sujidades leves: larvas em qualquer fase de desenvolvimento, artrópodes / fragmentos de artrópodes, foram visualizados em dois *pools* amostrais referentes ao produtor I (Prancha 3), o correspondente a 18,1% do total analisado.

Para o produtor II, nenhuma amostra apresentou contaminação pelas sujidades microscópicas referidas.



Prancha 3: Artrópodes / fragmentos visualizados com auxílio de microscopia óptica e uso de lugol em amostras de vegetais minimamente processados. Aumento 200x e 400x.

5.3.3 Contaminação por indicadores de contaminação fecal

As densidades de bactérias indicadoras de contaminação fecal (*Escherichia coli* e *Enterococcus* sp.) apresentaram variações em relação aos produtores (I e II) em todos os meses de coleta. Do total de amostras analisadas, apenas uma apresentou valores de *E. coli* muito acima dos critérios estabelecidos por lei (Tabela 11).

Para o produtor I, as concentrações de *E. coli* foram aferidas em valores mínimos de <1,0 NMP/100mL e máximos de 1986,3 NMP/100mL. O mesmo ocorreu para o indicador *Enterococcus* sp. Para o produtor II, as concentrações de *E. coli* variaram de <1,0 NMP/100mL a 3,1 NMP/100mL, enquanto *Enterococcus* sp. de <1,0 NMP/100mL a 1986,3/ 100mL (Tabela 11), demonstrando excelente qualidade microbiológica.

Quando consideradas as concentrações de *E. coli* isoladamente, o produtor II atendeu a preconização da legislação vigente em todas as amostras, no entanto, ao considerar-se um segundo parâmetro – enterococos – má qualidade sanitária foi verificada, inclusive com média muito superior à verificada para *E. coli* (Tabela 11).

Ademais, quanto ao produtor I, quando revelado maior impacto de contaminação fecal em relação à *Escherichia coli*, (*pool* 1) também observou-se contaminação por *Giardia* por ambas as técnicas utilizadas (RID e PCR). Porém, para os *pool* de amostras de número 2, 3 e 5, considerados aptos ao consumo humano de acordo com a concentração de *E. coli* (<1.0 NMP/ 100mL), a contaminação por *Giardia* foi evidenciada, quer seja por RID ou PCR (Tabelas 10 e 11).

Do mesmo modo, no único *pool* amostral do produtor II, em que se aferiu contaminação pelo protozoário mediante amplificação de fragmento do gene β -giardina (β g), observou-se padrão microbiológico <1,0 NMP/ 100mL, compatível ao preconizado para o consumo humano.

Tabela 11: Concentração de bactérias indicadoras expressas em número mais provável (NMP /100mL) presentes em amostras de vegetais minimamente processados de dois diferentes produtores (Grupo III).

Pool	<u>Minimamente processado – produtor I</u>			<u>Minimamente processado – produtor II</u>		
	Coliformes totais	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	Coliformes totais	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.
1	>2.419,6	1.986,3	<1,0	2.419,6	<1,0	<1,0
2	2.419,6	<1,0	1986,3	2.419,6	<1,0	1986,3
3	2.419,6	<1,0	<1,0	1986,3	<1,0	<1,0
4	302,6	<1,0	<1,0	110,7	<1,0	<1,0
5	>2.419,6	<1,0	2	>2.419,6	<1,0	1553,1
6	>2.419,6	<1,0	6	>2.419,6	<1,0	167,1
7	>2.419,6	<1,0	165,2	38,4	3,1	200,5
8	>2.419,6	<1,0	41,4	>2.419,6	<1,0	57,8
9	>2.419,6	<1,0	<1,0	NR	NR	NR
10	>2.419,6	8,1	119,1	-	-	-
11	>2.419,6	<1,0	<1,0	-	-	-
Médias	2227,1	181,1	211,3	1778,9	1,26	495,9

NR = Não realizado; - sem amostragem

5.3.4 Interpretação dos resultados da qualidade sanitária dos vegetais minimamente processados.

Após as análises, os vegetais minimamente processados foram classificados como próprios ou impróprios conforme descrito na tabela 12. Desta forma, três amostras foram classificadas como impróprias para o consumo humano, todas oriundas do produtor I.

Os pools amostrais um e dois apresentaram não conformidades em mais de dois critérios preconizados por legislações: ausência de parasitos (helmintos e/ou protozoários em qualquer fase de desenvolvimento), perfil microbiológico acima do tolerado para a bactéria indicadora *Escherichia coli* e alterações indesejáveis das características sensoriais (alterações físicas e odor característico), respectivamente (Tabela 12).

O *pool* de número nove também apresentou alterações sensoriais, sendo classificado como alimento deteriorado.

Todos os *pool* de vegetais minimamente processados do produtor II, estiveram de acordo com os preceitos de ambas as legislações.

Tabela 12 Critérios utilizados para avaliação da qualidade sanitária dos vegetais prontos para o consumo de acordo com as preconizações de legislações no Brasil.
RDC nº14/ 2014 **Instrução normativa 60 (Brasil, 2019)**

Pool/Produtor		Ovos / larvas de helmintos	Cistos / oocistos	Alimentos deteriorados (características sensoriais).	Artrópodes / fragmentos	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.*	Próprio/impróprio
Padrão *	Ausência	Ausência	Ausência	Ausente	Não se aplica	Até 10 ²	Ausente	Ausente
Limite máximo tolerável								
1/I	Ausência	Presença	Presença	Presença	Presença	1,986,3	Ausência	I
2/I	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	<1,0	Ausência	P
3/I	Ausência	Presença	Presença	Presença	Ausência	<1,0	Ausência	I
4/I	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	<1,0	Ausência	P
5/I	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	<1,0	Ausência	P
6/I	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Presença	<1,0	Ausência	P
7/I	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	<1,0	Ausência	P
8/I	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	<1,0	Ausência	P
9/I	Ausência	Ausência	Ausência	Presença	Ausência	<1,0	Ausência	I
10/I	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	8,1	Ausência	P
11/I	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	<1,0	Ausência	P
1/II	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	<1,0	Ausência	P
2/II	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	<1,0	Ausência	P
3/II	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	<1,0	Ausência	P
4/II	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	<1,0	Ausência	P

5/II	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	<1,0	Ausência	P
6/II	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	<1,0	Ausência	P
7/II	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	3,1	Ausência	P
8/II	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	<1,0	Ausência	P
9/II	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	NR	NR	-

* Análises complementares realizadas por procedimento operacional padronizado pelo Lacen; NR = Não realizado.

6. DISCUSSÃO

O Brasil é considerado um dos maiores produtores de hortifrutigranjeiros do mundo e um dos maiores produtores de alimentos orgânicos da América Latina (Lima et al., 2020).

Paralelamente à expansão da agricultura orgânica no país, há um incremento da contaminação do cultivo por patógenos entéricos, em particular, devido ao uso intensivo de esterco/adubo principalmente de origem animal, e de água oriunda de fontes não tratadas, logo na primeira etapa da cadeia produtiva (Chaidez et al, 2005, Moreno et al., 2018, Rusinol, 2020).

A água de irrigação é atualmente apontada como uma via relevante associada à contaminação de vegetais, especialmente nos países em desenvolvimento (Karanis et al., 2007; Xiao et al, 2018). Usualmente, as águas superficiais (brutas) são as principais fontes hídricas utilizadas na agricultura (Yasuor et al., 2020), entretanto, estão sujeitas a contínua deterioração por despejo de esgoto doméstico *in natura* e/ou demais fontes de contaminação de origem zoonótica, impactando diretamente bacias hidrográficas utilizadas para fins agrícolas (Karanis et al., 2007, Moreno et al., 2018, Xiao et al., 2018).

No presente estudo, a pesquisa da contaminação por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foi realizada em diferentes pontos amostrais de água destinada à irrigação de hortaliças, sendo este o primeiro estudo a avaliar a qualidade da água utilizada para o cultivo de vegetais orgânicos certificados e comercializados na capital do estado. Dos três pontos monitorados, a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. foi confirmada em 20% das amostras hídricas dos pontos 1 e 2, ambiente lótico e lântico, respectivamente.

Destaca-se que o monitoramento da qualidade sanitária dos diferentes pontos amostrados nesse estudo são relevantes dado que, compõe parte da Bacia Hidrográfica do Rio Capivari, um dos principais cursos d'água que banham quatro municípios da Região Metropolitana de Curitiba: Almirante Tamandaré à oeste, Bocaiúva do Sul a leste, Colombo, ao sul, e Rio Branco do Sul ao norte, sendo esta localizada a aproximadamente 20 km da capital do estado.

Apesar dos protozoários não terem sido identificados diretamente na água que é aspergida para irrigação (P3), a água captada advém do ponto 1 (água bruta do Rio Capivari) e, é represada no ponto 2, para posterior sucção e irrigação do cultivo. Sendo assim, ambos os protozoários patogênicos foram detectados em importantes concentrações nas águas superficiais, tanto em ambiente lótico como lântico.

Os resultados encontrados convergem com demais estudos realizados no Brasil. No estado de São Paulo, cidade de Campinas, uma avaliação conduzida em águas superficiais de mananciais demonstrou positividade para cistos de *Giardia* spp. em 100% das amostras analisadas - concentrações de 33 a 95 cistos/L (Franco et al., 2001), sendo essas, superiores às concentrações encontradas no presente estudo – 29,6 a 32,2 cistos/L.

Em contraponto, na cidade de Viçosa/MG, a contaminação por *Giardia* spp. foi confirmada em dois diferentes mananciais utilizados para a captação e abastecimento de água com positividade de 92% e 58%, em concentrações médias inferiores - 4 a 7 cistos/L (Heller et al., 2004).

Em mananciais de diferentes cidades do Paraná, também utilizados para o abastecimento público, apenas cistos de *Giardia* spp. foram detectados em 8,3% e 19,9% nas cidades de Londrina e Maringá respectivamente (Nishi et al., 2009; Almeida et al., 2015).

Apesar de ambos os protozoários terem sido identificados em número similar de amostras nesse estudo, cistos de *Giardia* spp. são mais frequentemente identificados em águas brutas superficiais no Brasil, onde a epidemiologia ambiental do protozoário é melhor compreendida nas regiões sudeste e sul, estados onde há maior concentração de estudos conduzidos para este fim. Ademais, a giardiose é considerada uma protozoose endêmica no Brasil (Coelho et al., 2017; Rosado-García et al., 2017; Fantinatti et al., 2020).

Em adição, os resultados denotam que a água utilizada para irrigação pode ser responsável pela introdução de ambos os protozoários no cultivo de orgânicos na cidade de Rio Branco do Sul. A contaminação por ambos os protozoários também pode estar atrelada com a variação pluviométrica (promovendo ressuspensão de sedimentos), atividade humana e/ou rural adjacentes, presença de gado, especialmente bezerros jovens - considerados uma importante fonte de contaminação ambiental e, presença de animais selvagens e pássaros aquáticos, que podem carrear cistos e oocistos (Thompson et al., 2009, Plutzer e Tomor, 2009, Swirski et al., 2016).

Outros fatores físico-químicos também podem estar relacionados com a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em diferentes ambientes aquáticos, especialmente a temperatura, pH e turbidez (Lechevallier e Norton, 1992, Fayer et al., 1998, Kumar et al., 2016). No presente estudo, até a irrigação de diferentes cultivos - durante o trajeto da água do ponto 1 para o ponto 3 - observou-se acidificação inicial da água e tendência à neutralidade durante a aspersão. O aumento da turbidez também foi verificado entre as etapas até a irrigação. As maiores taxas de turbidez foram verificadas para o ponto 4 – após a lavagem dos vegetais. Estes resultados não são surpreendentes, visto que para este ponto, diversos cultivos são higienizados no mesmo container, inclusive carregando terra pelas raízes ou presente nos diferentes vegetais.

Para as amostras do grupo I em que se aferiu positividade para ambos os protozoários, ensaios de biologia molecular foram conduzidos, no entanto, em nenhum deles observou-se amplificação de DNA.

A Reação em Cadeia da Polimerase apresenta alta sensibilidade para a detecção de protozoários, contudo, quando empregada em amostras ambientais complexas, como águas brutas impactadas, pode ter sua eficiência diminuída frente a presença de grande quantidade de inibidores e, componentes naturais de ambientes lóticos e lênticos, como ácidos húmicos e fúlvicos, comprometendo a performance da reação (Jakubowski et al., 1996; Girones et al., 2010). Além disso, (oo)cistos são frequentemente detectados em pequenas concentrações, o que também pode inviabilizar a PCR devido a pequena concentração de DNA (Girones et al., 2010).

Ressalta-se que atualmente a marcação com DAPI para evidenciar núcleos dos protozoários é estimulada por atuar como importante sinalizador do sucesso e eficácia da amplificação de DNA por PCR (Kifleyohannes e Robertson, 2020), sendo que somente um (oo)cisto foi identificado em microscopia de fluorescência nas águas superficiais da bacia estudada, considerados positivos na RID e sem marcação em DAPI (negativo).

A área em questão está localizada em zona rural de elevada preservação ambiental. Essa característica pôde ser constatada mediante os resultados das análises microbiológicas, especialmente para *E. coli* nos três pontos avaliados, sendo aferida em baixas concentrações.

Entretanto, a contaminação por protozoários foi evidenciada, por exemplo em dezembro de 2019, onde a presença de *Giardia* foi identificada e a concentração de *E. coli* aferida em 5.0 NMP/ 100mL. Além disso, a presença de fezes de animais próximo às margens do açude foi constantemente observada ao longo do estudo.

A contaminação por bactérias indicadoras foi detectada nos três pontos referentes à água de irrigação dos vegetais, dentre os quais, as maiores taxas de contaminação foram observadas apenas ao se inserir a pesquisa de um indicador complementar de contaminação fecal – *Enterococcus* sp. Este fato sinaliza para a importância de se instituir o monitoramento de mais de um parâmetro para aferição da qualidade microbiológica da água destinada à irrigação de cultivos vegetais.

A concentração de bactérias indicadoras varia em ambientes lóticos e lênticos, como demonstrado por Yamashiro et al. (2015) onde a densidade de indicadores foi maior em ambientes lóticos quando comparado a outros dois pontos considerados lênticos, em uma grande represa utilizada para o abastecimento da população de cidades do interior de São Paulo e para a recreação humana.

Estes dados diferem dos evidenciados no presente estudo, onde no represamento de água, formando uma espécie de açude utilizado para captação (P2) e posterior aspersão de vegetais, promoveu acúmulo de matéria orgânica e maior densidade bacteriana.

A alta prevalência de microrganismos indicadores de contaminação fecal em águas de irrigação está intimamente relacionada ao uso de água não tratada, assim como relaciona-se este hábito agrícola à disseminação de *Cryptosporidium* e *Giardia*, visto que mesmo quando o esgoto recebe o devido tratamento, uma pequena fração retorna para os mananciais (Amorós et al., 2010., Franco et al, 2012, Javanmard et al., 2018, Yamashiro et al., 2019).

No período pós-colheita, os vegetais são submetidos a etapa de pré-lavagem, cuja água utilizada após este processo, também foi objeto do presente estudo (Ponto 4). Esta amostra por sua vez, é considerada importante, por refletir o índice de contaminação de toda a etapa de cultivo, visto que reflete a lavagem de diversos tipos de vegetais (folhas, raízes e tubérculos).

De fato, diferentemente dos demais pontos do Grupo I, a contaminação por ambos os gêneros de protozoários foi evidenciada neste local de amostragem, assim como a presença do protozoário *Balantioides coli*, detectado em 40% das amostras analisadas.

Balantidium coli é o único protozoário ciliado intestinal com potencial patogênico para seres humanos sendo a balantidiose crônica assintomática a mais comumente identificada (Ahmed et al., 2020). Contudo, em alguns hospedeiros a doença pode evoluir para disenteria severa, associada à invasão tecidual, sendo também considerado um patógeno de caráter oportunista (Ferry et al., 2004, Gomez Hinojosa et al., 2019).

Recentemente, houve a proposição de reclassificação taxonômica do protozoário devido a diferenças genéticas entre *B. coli* e demais espécies de *Balantidium*, onde atualmente, há consenso e preferência pela utilização da nomenclatura acerca de *Balantioides coli*, sendo esta inclusive adotada em todos os estudos recentes nas maiores bases de dados como o GenBank (Ponce-Gordo e García-Rodríguez, 2021).

O parasito também apresenta potencial zoonótico por infectar o trato gastrointestinal de animais de produção como suínos e gado, sendo os suínos selvagens e domésticos considerados os seus maiores reservatórios (Ahmed et al., 2020). Desta forma, é razoável inferir que a contaminação do cultivo das diversas hortaliças por este protozoário na água de lavagem seja oriunda de animais e, associada à utilização de adubo orgânico contaminado, embora não se possa descartar a hipótese da contaminação antroponótica pela população autóctone.

Em visita inicial para a escolha das fazendas produtoras certificadas de orgânicos da cidade, constatou-se que mais de um tipo de adubo orgânico é empregado, entre eles oriundo de fezes de perus, bem como também se verificou a presença de criação de gado bovino e suíno em algumas propriedades.

Ademais, a maior prevalência da contaminação por parasitos na etapa de comercialização em feiras-livres (grupo II) foi evidenciada para cistos de *Balantioides coli*, em alfaces orgânicas produzidas na mesma região agrícola, confirmando que esse tipo de alimento é posteriormente transportado e distribuído para o consumidor final contaminado.

Destaca-se que diversos estudos relataram a presença do protozoário em amostras hídricas, no entanto, as fontes de contaminação não foram estabelecidas na maior parte dos casos (Ayaz et al., 2011). A ocorrência da contaminação por *Balantioides coli* em vegetais destinados ao consumo humano também foi relatada em países em desenvolvimento, tais como: Bangladesh, Brasil, República dos Camarões, Etiópia e Gana, com taxa média de contaminação de 9.3%, inferior à encontrada no presente estudo (Ahmed et al., 2018).

A resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), para águas doces de classe I e II, utilizadas para irrigação de hortaliças ingeridas cruas não é atualizada há mais de 15 anos, valendo-se da preconização da pesquisa de coliformes termotolerantes (Brasil, 2005), critério muito menos restritivo aos utilizados para identificação e enumeração da contaminação fecal no presente estudo.

Assim como evidenciado nos diferentes pontos de água de irrigação, a contaminação mais expressiva relacionada à etapa de pré-comercialização dos vegetais (água de lavagem) somente foi evidenciada para bactérias do gênero *Enterococcus*. Este grupo apresenta ampla resistência a larga variação de temperatura, pH e salinidade, favorecendo a persistência da contaminação e sobrevivência por períodos prolongados em ambientes hídricos captados para irrigação (EPA, 2000, Solaiman et al., 2020).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) sugere a pesquisa de *Enterococcus* como um indicador adicional de contaminação fecal em

amostras hídricas (EPA, 2000). Ressalta-se ainda, que o FDA (Food and Drug Administration) estabelece padrões microbiológicos para água de irrigação que assegurem a segurança do alimento (FDA, 2017).

Tais padrões fazem parte da Lei de Modernização da Segurança Alimentar dos Estados Unidos (FSMA) - *Food Safety Modernization Act*, sendo exigido o estabelecimento de um perfil de qualidade da água (MWQP) - *microbial water quality profile*, para todas as fontes hídricas não tratadas utilizadas no cultivo de hortifrutigranjeiros, onde deve ser analisado um número de no mínimo 20 amostras por um período de 2 a 4 anos.

As menores médias para ambos os indicadores bacteriológicos de contaminação fecal dos quatro pontos que compõem a região de cultivo de hortaliças foi identificada no ponto 4. Ressalta-se que a água utilizada para a lavagem das hortaliças neste ponto amostral procede de fonte hídrica subterrânea (água de poço), quando comparada à água superficial (bruta) sujeita a maior impacto de contaminação fecal.

As análises da água de poço, utilizadas para o procedimento supramencionado e para o consumo dos produtores, apresentaram excelente qualidade microbiológica, quando considerada a contaminação por *E. coli*.

Grande parte das legislações no Brasil e no mundo se referem apenas à qualidade microbiológica da água utilizada para irrigação de hortaliças, com base em densidades de coliformes e *Escherichia coli*, entretanto, diversos estudos não estabeleceram clara correlação entre os indicadores e a presença de helmintos e protozoários parasitos (Moreno et al., 2018, Rusinõl et al., 2020).

Múltiplos fatores estão relacionados às diferentes rotas de exposição a protozoários parasitos patogênicos, refletindo as condições de vida e saneamento em zonas rurais, além da contaminação do meio aquático e possíveis escoamentos de fezes

de animais de criação, dado o caráter zoonótico das parasitoses (Abdel-Moein e Saeed, 2016; Troldborg et al., 2017; Ryan et al., 2019; Ahmed et al., 2020).

Em relação ao grupo II, hortaliças orgânicas oriundas de feiras-livres, com o intuito de maximizar a recuperação de ovos, cistos e oocistos a partir de diferentes hortaliças, a escolha da solução extratora de lavagem, bem como a determinação do pH da solução que será utilizada, são considerados aspectos críticos, para maior recuperação de parasitos (Cook et al., 2007; Matosinhos et al., 2016).

De fato, alguns estudos demonstraram que diferentes faixas de pH de solução de glicina 1M influenciaram na recuperação de protozoários patogênicos em alface contaminada artificialmente. Para *Giardia duodenalis*, os melhores resultados foram obtidos ao utilizar essa solução com pH entre 5.0 e 6.0, com eficiências entre 34,9 a 39,3%, porém com maior desvio padrão, especialmente na faixa de 5,5 (Cook et al 2007). Ao utilizar a solução com pH mais baixo, entre 3.0 e 4.0, as taxas de recuperação de cistos e a performance da metodologia decaiu consideravelmente – 3.0 a 5,4%.

Na mesma linha, Cook et al. (2006) realizaram previamente a análise da eficácia de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em alfaces e frutos silvestres contaminados artificialmente, verificando maiores taxas de recuperação ao utilizar solução de glicina 1M, pH 5,5.

Desta forma, para o presente estudo, optou-se por utilizar como solução extratora a glicina 1M, com pH ajustado para 5,5, permitindo a detecção concomitante de ambos os protozoários e também ovos de helmintos. Essa mesma solução mostrou-se eficiente para recuperação de ovos de *Ascaris suum* e ancilostomatídeos em alface contaminada artificialmente em protocolo padronizado por Matosinhos et al. (2016).

Em adição, a validação do método e avaliação das taxas de eficiência de recuperação de ovos de *Ascaris suum* em alface e rúcula contaminadas artificialmente,

foi aferida em triplicata concomitantemente, por nove diferentes laboratórios de cinco estados do Brasil e, um laboratório considerado como central, com experiência em análise de alimentos (Pineda et al., 2021), apresentando excelente performance, com média interlaboratorial de recuperação de 57,10% para alface e de 50,7% para rúcula.

Ressalta-se que quando o pH é utilizado abaixo de 4.0, promove excessivo rompimento de células dos vegetais gerando um eluente colorido e com aumento de material particulado (Cook et al., 2006), o que pode mascarar ou dificultar a visualização de parasitos.

Isolado pela primeira vez pelo pesquisador francês H. Braconnot a partir de hidrolisados ácidos de proteínas, o sabor deste aminoácido é doce, análogo à glicose, sendo seu nome derivado da palavra grega "glykys" - um aminoácido apolar, codificado pelo código genético. Este é também um dos componentes das proteínas de seres vivos, com características tensoativas capaz de interagir com cistos, oocistos e ovos que podem estar fortemente aderidos à matriz vegetal facilitando a sua remoção (Cook et al., 2006, Wang et al., 2013, Razak et al., 2017).

Destaca-se que todo alimento destinado ao consumo humano deve ser livre de contaminantes físicos, químicos e biológicos - como parasitos em qualquer fase de desenvolvimento (BRASIL, 2014). Além disso, deve apresentar padrões microbiológicos dentro dos limites máximos tolerados (LMT) estabelecidos por legislação (falta referência da legislação referente aos padrões microbiológicos).

Alguns estudos identificaram compostos tóxicos resultantes do processo de desinfecção a partir de soluções cloradas utilizadas para sanitização de frutas e hortaliças, dentre eles, os trihalometanos, cuja exposição contínua é associada à importantes alterações epigenéticas (Berbari et al., 2001, Bari et al., 2003, López-Gálvez et al., 2010, Bachelli et al., 2013).

Em alguns países, como Alemanha, França e Estados Unidos o uso do hipoclorito de sódio como sanitizante de hortaliças já é restrito, sendo inclusive preconizado que alimentos minimamente processados apresentem ausência de cloro residual em seus produtos. Sendo assim, a utilização e desenvolvimento de soluções alternativas ao cloro emergem como uma questão relevante para os órgãos públicos e iniciativa privada, tendo em vista a garantia da segurança dos alimentos para o consumidor (Baur et al., 2004, Bachelli et al., 2013).

Para o grupo II, foi observado um total de 16,3% de contaminação por ovos de helmintos e cistos de protozoários, sendo as maiores taxas de contaminação observadas quanto à detecção de *Balantioides coli* - 44,5% das amostras positivas. Tais achados podem também refletir o uso de adubo orgânico nas hortaliças cultivadas no grupo I, de fontes que não garantam inocuidade aos vegetais e/ou acesso de animais domésticos às áreas de cultivo, evidenciados durante as coletas - visto que ovos de ancilostomatídeos e de *Trichuris* sp. foram detectados.

A criação de animais em zonas rurais produtoras de hortaliças contribui para a disseminação de parasitos de caráter zoonótico no ambiente, e conseqüentemente, para a contaminação dos hortifrutigranjeiros cultivados nestas regiões. Okulewicz et al. (1997), detectaram infecção por parasitos intestinais em 100% de cães e gatos em fazendas produtoras (Klapec e Borecka, 2012).

A detecção de ovos de *Hymenolepis nana* também sugere que roedores podem estar presentes nas plantações. Além disso, não se descarta a possibilidade da utilização de fezes humanas como adubo, visto que ovos de *Ascaris* sp., também foram identificados ou ainda, o carreamento de material fecal humano contendo estes ovos por vetores mecânicos, ademais, a dispersão por ventos, visto que nas propriedades localizadas na

cidade de Rio Branco do Sul, o acesso ao saneamento básico não está disponível, sendo utilizadas fossas sépticas (Fallah et al., 2012; J. Hotez., 2018; Sadowska et al., 2019).

Ressalta-se que *Ascaris lumbricoides* é o helminto transmitido pelo solo (STH) mais prevalente em humanos em todo o mundo. Estima-se que aproximadamente 1,3 bilhão de pessoas estejam acometidas por este parasito, haja visto que cada fêmea apresenta alta fecundidade favorecendo a contaminação e dispersão ambiental. Além disso, a ocorrência da contaminação em vegetais frescos é frequentemente relatada em regiões tropicais, como o Brasil (Pilotte et al., 2019, Bowman, 2021).

O consumo de vegetais *in natura*, sem qualquer processo de cocção, o caráter zoonótico e antroponótico, a baixa dose infectante, aliada a persistência ambiental e resistência a procedimentos de desinfecção, são os principais fatores contribuintes relacionados às infecções parasitárias de origem alimentar (Xiao et al., 2018; Ryan et al., 2019; Sakkas et al., 2020).

Ademais, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) destacam que nos países em desenvolvimento e emergentes, incluindo o Brasil, as geohelmintoses e as helmintoses transmitidas por alimentos contaminados ainda apresentam ampla expressividade, sendo causas frequentes de mortalidade e morbidade (WHO, PAHO, 2016). A presença destes parasitos em alimentos acarreta perdas econômicas, como a diminuição do valor de mercado dos produtos, particularmente em zonas rurais produtoras, contribuindo também com a perpetuação do ciclo da pobreza em populações de baixo poder aquisitivo (WHO, 2014, WHO, PAHO, 2016).

A contaminação por diversas espécies de helmintos e protozoários intestinais em hortaliças *in natura* já foi reportada na Índia (Gupta et al, 2009), Líbia (Abougrain et al., 2010), Egito (Said, 2012), Canadá (Dixon et al., 2013), Vietnã (Chau et al., 2014) e Itália

(Caradonna et al., 2017). No Brasil, o mesmo foi verificado em alguns estados do país (Oliveira Germano, 1992; Coelho et al., 2001; Pezzin et al., 2017; Ferreira et al., 2018).

Tomados em conjunto, os resultados dos quatros pontos de água relacionados ao cultivo ou higienização de hortaliças no grupo I, associado à análise de hortaliças cultivadas nesta cidade e comercializadas na capital do Paraná em feiras livres, demonstram importante impacto de contaminação por parasitos, implicando em potencial risco de aquisição de doenças parasitárias, inclusive de caráter zoonótico.

Com relação a qualidade sanitária de minimamente processados, estudos que avaliem a segurança quanto a contaminantes biológicos, em especial para protozoários parasitos em vegetais frescos prontos para o consumo, são escassos no Brasil e no mundo (Ryan et al., 2019).

No presente estudo, para o grupo III a contaminação por ovos de helmintos não foi detectada em nenhum *pool* de amostras analisado nos vegetais prontos para consumo de ambos os produtores, demonstrando, para este aspecto, boa qualidade higiênico-sanitária, visto que os parasitos pesquisados são transmitidos por via oro-fecal.

Entretanto, a contaminação por *Giardia* foi evidenciada em 25% dos *pool* de amostras de dois dos principais produtores de vegetais minimamente processados com distribuição regional. Ressalta-se que para a realização de um desenho amostral representativo, a adoção de estratégia de análise por *pool* é relevante, quando se considera amostras alimentares como as analisadas no presente estudo, sanificadas, diminuindo custos e com maior possibilidade de confirmação da contaminação. Essa estratégia é amplamente empregada em outras matrizes alimentares, como por exemplo moluscos bivalves comestíveis (Robertson et al., 2007; Leal et al., 2021).

Para o produtor I, 36,3% dos *pool* apresentaram contaminação por *Giardia* evidenciada por diferentes técnicas de detecção – RID ou PCR, dos quais, a contaminação

por *G. duodenalis* foi confirmada em três diferentes pools amostrais através das análises moleculares.

Em relação ao produtor II, não foram detectadas as formas infectantes de ambos os protozoários por RID, entretanto, a contaminação por *Giardia duodenalis* foi detectada em um *pool* amostral (11,1%) - mediante amplificação do marcador molecular *β-giardina* (*BG*). Quando comparados os resultados encontrados para ambos os vegetais minimamente processados, evidencia-se melhor qualidade higiênico-sanitária nas amostras oriundas desta indústria de processamento.

As complexas matrizes alimentares interferem na recuperação, eluição e extração de DNA de cistos e oocistos, além disso, apenas em 2016 foi publicado um método padronizado para detecção e enumeração de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em vegetais verdes folhosos e frutos de baga - ISO nº 18744, não havendo até o momento, um protocolo / ISO para a identificação de ovos e larvas de helmintos nesse tipo de alimento.

Neste estudo, foram realizadas análises moleculares mediante amplificação dos quatro marcadores mais amplamente utilizados em todo o mundo para detecção e caracterização das espécies de *Giardia* (Feng e Xiao, 2011; Koehler et al., 2014, Ryan et al., 2019). Dentre esses, a contaminação pelo protozoário foi identificada em uma amostra para o gene *18S rRNA* e pelo gene *beta-giardina*, respectivamente.

Para o marcador *TPI*, a contaminação pelo protozoário foi identificada em dois *pool* amostrais, ambos pertencentes ao produtor I. As análises filogenéticas demonstraram a presença de *Giardia duodenalis*, pertencente ao grupo genético B. Ressalta-se que *G. duodenalis* é a única espécie que possui capacidade para infectar humanos, sendo as assembleias A e B as mais predominantes em infecções, além de serem reconhecidas por apresentar importante caráter zoonótico (Feng e Xiao, 2011; Ryan et al., 2019).

Destaca-se que tais achados representam o primeiro relato de contaminação por *Giardia duodenalis* em vegetais minimamente processados (*Ready-to-Eat*) no Brasil, e que poucos estudos ao redor do mundo foram capazes de identificar os grupos genéticos do protozoário em alimentos que foram submetidos a processos de higienização pela indústria alimentícia. Desta forma, este estudo contribui para a compreensão da epidemiologia ambiental e molecular do protozoário e com dados de inferência acerca do potencial infectante dos isolados nessas matrizes alimentares, bem como seus impactos quanto à segurança do alimento.

Diversos estudos epidemiológicos moleculares envolvendo amostras fecais humanas de diferentes regiões demográficas demonstraram que o grupo genético / assembleia B de *G. duodenalis* é o mais frequentemente associado a quadros clínicos sintomáticos, como cólicas abdominais e presença constante de vômitos (Mahdy, 2009, Homan et al., 2001)

O gene *TPI* apresenta regiões altamente conservadas e é considerado polimórfico e os iniciadores utilizados contemplam *locus* de grande heterogeneidade genética para o protozoário, sendo, portanto, considerado um dos marcadores filogenético mais precisos (Sulaiman et al., 2003).

A identificação dos grupos genéticos A e B mediante utilização do gene *TPI* pode inclusive auxiliar na avaliação de infecções mistas em amostras clínicas, além disso, contribuem com informações para compreensão da severidade dos quadros clínicos da giardiose (Amar et al., 2002, Robertson et al., 2007).

Os resultados obtidos fornecem importantes dados epidemiológicos acerca das áreas de estudo, com possibilidade de rastreabilidade das fontes de infecção, visto que o grupo genético B está relacionado com importante transmissão de caráter zoonótico (Ankarklev et al., 2018; Ryan et al., 2019) e que, ambos os produtores são oriundos de

grandes municípios produtores rurais de hortaliças da região metropolitana de Curitiba, onde a presença de animais pode ser frequente.

De fato, o grupo genético B e os subgrupos B-III e B-IV são comuns em humanos, inclusive em manipuladores de alimentos prontos para o consumo. Um estudo conduzido no Brasil identificou este grupo genético em manipuladores de escolas públicas, por conseguinte, em pesquisas anteriores o mesmo grupo genético já havia sido identificado em amostras fecais de alunos da mesma instituição (Colli et al., 2015 a,b).

Não obstante, no ano de 2015 ocorreu um surto de giardiose na cidade de Nova York (EUA), envolvendo aproximadamente 20 casos ligados a uma rede de supermercados. Nas análises moleculares realizadas em amostras fecais de manipuladores envolvidos na produção de alimentos prontos para o consumo, constatou-se infecção por *Giardia duodenalis*, pelo subgrupo genético BIII, que possivelmente pode ter sido a fonte de origem da contaminação e do surto (Figgatt et al., 2019, Ryan et al., 2019).

A transmissão de protozoários intestinais, como *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. através das mãos dos manipuladores de alimentos também apresenta relevância e é considerada um grande desafio aos setores produtivos; portadores assintomáticos representam um risco para a inserção de patógenos em diferentes etapas da cadeia produtiva: pré-preparo, produção, processamento, distribuição e manuseio na exposição ao consumidor final (Yimam et al., 2020, Teimouri et al., 2021).

Neste contexto, reitera-se a necessidade de realização de exames parasitológicos de fezes de modo frequente em manipuladores de alimentos, onde até mesmo a identificação de organismos considerados na maioria das vezes, como classicamente comensais, como as amebas identificadas no presente estudo – *Iodameba bütschlii*,

denotam o status higiênico-sanitário dos alimentos ou até mesmo contato com material fecal em portadores são (Iglesias-Osores e Failoc-Rojas, 2018).

Para o grupo de hortaliças minimamente processadas referentes ao produtor I a qualidade higiênico sanitária apresentou índices preocupantes em termos de segurança alimentar, quando comparado ao produtor II, que apresentou melhor qualidade em ambos os indicadores, microbiológicos e parasitológicos. Ressalta-se que, este tipo de matriz alimentar é oriundo de processamento industrial, onde, assegura-se a realização do processo de desinfecção - um dos pontos mais críticos da cadeia produtiva - e de importância para a inativação de patógenos de origem alimentar.

Desta forma, os resultados demonstram falhas nos procedimentos operacionais padronizados e ineficácia do procedimento empregado pelo produtor para a remoção de bactérias indicadoras de contaminação fecal e protozoários intestinais.

A utilização da PCR como ferramenta de diagnóstico e rastreabilidade tem sido cada vez mais explorada por apresentar ampla sensibilidade e especificidade. Exemplificando, no Brasil um estudo direcionado para a pesquisa de *Giardia* em vegetais verdes folhosos obteve taxa de positividade de 12,5% por PCR, superior ao detectado pela técnica imunológica, que denotou contaminação em 0,8% das amostras submetidas à análise. No entanto, ensaios moleculares podem apenas detectar material genético de parasitos e não cistos intactos e/ou infectantes, diminuindo assim as inferências em relação aos riscos em saúde pública (Tiyo et al., 2016, Ryan et al., 2019).

Por conseguinte, a associação de ambas as técnicas é fundamental para maior acurácia da confirmação de contaminação por *Giardia* e *Cryptosporidium*, detectando as formas infectantes e aferindo a rastreabilidade das fontes de contaminação como estratégia de minimização dos impactos de DTA e, como prevenção de surtos por veiculação hídrica e alimentar (Dixon et al., 2013, Ryan et al., 2019).

A subnotificação de surtos está associada a dificuldades na detecção de cistos e oocistos em matrizes alimentares, além disso, o início do quadro clínico pode ocorrer em 1 a 3 semanas após a ingestão das formas infectantes, fato que restringe a associação entre agente etiológico e alimento causador do surto (Baldursson e e Karanis, 2011, Robertson e Chalmers, 2013, Ryan et al., 2018).

No Brasil, de acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) apenas em 11 surtos de DTA o protozoário *Giardia duodenalis* foi o agente etiológico incriminado no período de 2007 a 2019, sendo que, parte destes foi ocasionado pela via hídrica, e parte não teve o alimento causador do surto esclarecido (BRASIL, 2021).

Um estudo realizado mediante ensaios de contaminação artificial tendo como modelo oocistos de *Cryptosporidium parvum* em espinafre hidropônico cultivado em laboratório, demonstrou capacidade de internalização das formas infectantes dentro dos estômatos dos vegetais, onde mesmo após vigorosa lavagem em solução de glicina 1M, com o uso de agitador orbital, foi possível evidenciar a persistência dos oocistos mediante visualização por microscopia confocal e marcação com anticorpos monoclonais específicos (Macarisin et al., 2010).

Ademais, ocorre aumento de turgidez em células vegetais que são cultivadas por meio de sistemas de irrigação constante, como no caso da aspersão, o que possibilita um alargamento das fissuras estomáticas, facilitando o acesso de cistos e oocistos (Macarisin et al., 2010). Tais achados representam grandes implicações em saúde pública, visto que, em situações de contaminação natural, o fenômeno de aderência e internalização pode atuar como uma camada protetora para formas infectantes de parasitos, impedindo a remoção pela lavagem mecânica e, mantendo possivelmente a viabilidade e infectividade intactas.

Apesar dos impactos em saúde pública, apenas recentemente a indústria de hortifrutigranjeiros despertou maior atenção à contaminação por vegetais prontos para o consumo por protozoários, após a ocorrência de surtos com inúmeros casos ligados ao consumo deste alimento no Reino Unido (Mckerr et al., 2015). Neste episódio, os estudos de genotipagem conduzidos para rastreabilidade das fontes de contaminação fecal, confirmaram a espécie *C. parvum*, como agente etiológico responsável (Mckerr et al., 2015; Sakkas et al., 2020).

Entretanto, apesar de frequentemente detectados em diversos tipos de alimentos, ainda se observa subnotificação de surtos associados a *Cryptosporidium* spp. pela via alimentar, visto que não é contemplado como agente infeccioso de notificação obrigatória, especialmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil (Brasil, 2006; Ahmed e Karanis, 2018; Ryan et al., 2019).

Algumas infecções de origem alimentar são consideradas endêmicas em determinadas regiões: apesar de existirem rigorosas normas regulatórias e robustos sistemas de notificação e vigilância nos países desenvolvidos, a ocorrência de surtos e *recalls* de alimentos se tornaram ameaça constante ao setor hortifrutigranjeiro (Soon et al., 2020). Desta forma, o monitoramento dos pontos críticos da cadeia produtiva de alimentos e a rastreabilidade das fontes de contaminação são essenciais para minimização das perdas econômicas e mitigação dos impactos em saúde pública a nível global (EFSA, 2019, Ryan et al., 2019).

Por conseguinte, o monitoramento e gerenciamento dos riscos associados ao consumo de vegetais *in natura*, devem ser iniciados na etapa de cultivo, associando a produção a práticas agronômicas que garantam a segurança do alimento, como a utilização de fertilizantes e recursos hídricos livres de contaminantes biológicos.

7. CONCLUSÕES

1. A contaminação fecal de origem zoonótica e/ou antroponótica por parasitos e bactérias indicadoras, foi evidenciada ao longo das diferentes etapas analisadas da cadeia produtiva, tanto na região de cultivo quanto na etapa de comercialização. Os resultados demonstram sua ampla disseminação na região metropolitana e na capital do Paraná e, sinalizam para a necessidade de adoção de medidas de controle e monitoramento constante da qualidade sanitária, para a garantia da segurança do alimento ao consumidor.
2. Oocistos de *Cryptosporidium* spp., cistos de *Giardia* spp., bem como a contaminação por *Escherichia coli* e especialmente por *Enterococcus* sp., foram detectados em diferentes concentrações e pontos de uma importante bacia hidrográfica utilizada para fins agrícolas em propriedades rurais certificadas, demonstrando que a mesma pode ser responsável pela contaminação de vegetais na etapa de cultivo.
3. A maior deterioração da qualidade microbiológica da água utilizada para a irrigação de orgânicos, somente foi aferida ao se inserir a pesquisa de um indicador complementar de contaminação fecal, considerado muito mais restritivo do que o preconizado pela legislação vigente. Desta forma, recomenda-se a pesquisa de pelo menos dois grupos de bactérias indicadoras para aferição da qualidade da água para este fim.
4. A água de lavagem foi considerada uma das etapas mais relevantes para evidenciar a contaminação por parasitos em diferentes vegetais na etapa de cultivo, sendo considerada um ponto crítico de controle. Ressalta-se a importância de utilização de fontes hídricas que apresentem boa qualidade microbiológica para a etapa de pré-lavagem que precede a comercialização.
5. Alfaves de variedade crespa (*Lactuca sativa*) cultivadas sob o sistema orgânico e comercializadas *in natura* em feiras-livres de Curitiba apresentaram importante impacto

de contaminação por parasitos. Ovos, cistos e oocistos podem manter sua capacidade infectante inalterada por longos períodos, ao longo da cadeia produtiva, e representar um risco de aquisição de doenças parasitárias, inclusive de caráter zoonótico.

6. Os procedimentos de higienização e sanitização adotados pela indústria alimentícia, não foram totalmente eficientes para a remoção de parasitos e inativação de bactérias em vegetais minimamente processados, visto que a contaminação residual por *E. coli*, *Enterococcus* sp. e *Giardia duodenalis*, foi confirmada em alguns *pool* amostrais prontos para o consumo.

7. A contaminação por *Giardia duodenalis* pertencente ao grupo genético B, em vegetais minimamente processados, foi relatada pela primeira vez no Brasil, evidenciando um sinal preocupante, por este grupo ser um dos principais relacionados à infecção sintomática pelo protozoário em seres humanos. Em adição, os resultados reforçam a ocorrência de possíveis falhas nos procedimentos operacionais padronizados empregados pelos produtores, podendo representar um risco à saúde dos consumidores.

8. As informações quanto à epidemiologia ambiental e molecular de parasitos em alimentos orgânicos ou prontos para o consumo são escassas em todo o mundo. Sendo assim, o sinergismo de diferentes técnicas de detecção que contemplem a pesquisa de ampla gama de contaminantes biológicos, tanto em vegetais *in natura*, como em minimamente processados, é necessário, visando reconhecer o perfil e rastreabilidade das fontes de contaminação em diferentes cultivos.

8. REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOEIN, K. A.; SAEED, H. The zoonotic potential of *Giardia intestinalis* assemblage E in rural settings. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 115, n. 8, p. 3197-3202, 25 abr. 2016.
- ABOUGRAIN, A. K.; NAHAISI, M. H.; MADI, N. S.; SAIED, M. M.; GHENGHESH, K. S. Parasitological contamination in salad vegetables in Tripoli-Libya. **Food Control**, [S.L.], v. 21, n. 5, p. 760-762, maio 2010.
- ADAM, E. A.; YODER, J. S.; GOULD, L. H.; HLAVSA, M. C.; GARGANO, J. W. Giardiasis outbreaks in the United States, 1971–2011. **Epidemiology And Infection**, [S.L.], v. 144, n. 13, p. 2790-2801, 11 jan. 2016.
- ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 447-475, jul. 2001.
- ADAMU, N. B.; ADAMU, J. Y.; MOHAMMED, D. Prevalence of helminth parasites found on vegetables sold in Maiduguri, Northeastern Nigeria. **Food Control**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 23-26, maio 2012.
- AHMADPOUR, E.; SAFARPOUR, H.; XIAO, L.; ZAREAN, M.; HATAM-NAHAVANDI, K.; BARAC, A.; PICOT, S.; RAHIMI, M. T.; RUBINO, S.; MAHAMI-OSKOUEI, M. Cryptosporidiosis in HIV-positive patients and related risk factors: a systematic review and meta-analysis. **Parasite**, [S.L.], v. 27, p. 27, 2020.
- AHMED, A.; IJAZ, M.; AYYUB, R. M.; GHAFFAR, A.; GHOURI, H. N.; AZIZ, M. U.; ALI, S.; ALTAF, M.; AWAIS, M.; NAVEED, M. *Balantidium coli* in domestic animals: an emerging protozoan pathogen of zoonotic significance. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 203, p. 105298, mar. 2020.
- AHMED, S. A.; KARANIS, P. An overview of methods/techniques for the detection of *Cryptosporidium* in food samples. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 117, n. 3, p. 629-653, 19 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-017-5735-0>.
- ALDEYARBI, H. M.; KARANIS, P. The Ultra-Structural Similarities between *Cryptosporidium parvum* and the Gregarines. **Journal Of Eukaryotic Microbiology**, [S.L.], v. 63, n. 1, p. 79-85, 6 ago. 2015.

ALLAIN, T.; BURET, A. G. Pathogenesis and post-infectious complications in giardiasis. **Giardia And Giardiasis, Part B**, [S.L.], v. 124, n. 12, p. 173-199, 2020.

ALMEIDA, J. C., MARTINS, F.D., FERREIRA NETO, J. M., SANTOS, M. M., GARCIA, J. L, NAVARRO, I. T., KURODA, E. K., FREIRE, R. L. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system, Parana, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 24 (3):303–8, 2015.

AMAR, C. F. L., DEAR, P. H., PEDRAZA-DIAZ, S., LOOKER, N, LINNANE, E., MCLAUCHLIN, J. 2002. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. **J. Clin. Microbiol.** 40:446–452.

AMORÓS, I.; ALONSO, J. L.; CUESTA, G. *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts on Salad Products Irrigated with Contaminated Water. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 73, n. 6, p. 1138-1140, 1 jun. 2010.

ANKARKLEV, J., JERLSTRÖM-HULTQVIST, J., RINGQVIST, E., TROELL, K., SVÄRD, S. G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 413-422, 2010.

APHA/AWWA/WEF (2017) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd Edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Denver.

APPELBEE, A.J.; FREDERICK, L.M.; HEITMAN, T.L.; OLSON, M. E. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 112, n. 4, p. 289-294, mar. 2003.

ARAÚJO, R. S., FERNANDES L. N., CARVALHO T.T., SATO M. I., SOARES R. M., MATTÉ G. R., MATTÉ M. H. Genotypic characterization of *Cryptosporidium hominis* from water samples in São Paulo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 5, p. 834-838, 2011.

ASADPOUR, M.; MALEKPOUR, H.; JAFARI, A.; BAHRAMI, S. Diversity of parasitic contamination in raw vegetables commonly consumed in SHIRAZ, southwest of Iran. **Asian Pacific Journal Of Tropical Disease**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 160-162, fev. 2016.

ASTIAZARAN-GARCIA, H.; LOPEZ-TEROS, V.; VALENCIA, M. E.; VAZQUEZ-ORTIZ, F.; SOTELO-CRUZ, N.; QUIHUI-COTA, L. *Giardia lamblia* Infection and Its

Implications for Vitamin A Liver Stores in School Children. **Annals Of Nutrition And Metabolism**, [S.L.], v. 57, n. 3-4, p. 228-233, 2010.

AYAS, S., KHAN, S., KHAN, S.N., BIBI, F., SHAMAS, S., AKHTAR., M. Prevalence of Zoonotic Parasites in Drinking Water of Three Districts of Khyber Pakhtunkhwa Province, Pakistan. **Pakistan J. Life Soc. Sci.** 9, 67–69, 2011.

BACHELLI, M. L. B.; AMARAL, R. Á.; BENEDETTI, B. C. Alternative sanitization methods for minimally processed lettuce in comparison to sodium hypochlorite. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s. l], v. 3, n. 44, p. 673-678, 2013.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks ∴ an update 2004∴2010. **Water Research**, [S.L.], v. 45, n. 20, p. 6603-6614, dez. 2011.

BARI, M. L., NAZUKA. E., SABINA, Y., TOSORIKI, S., ISSHIKI, K. Chemical and irradiation treatments for killing *Escherichia coli* O157:H7 on alfafa, radish, and mung bean seed. **J Food Prot** 66:767-774, 2003.

BASTOS, V. K.; CUTOLO, A. S.; DORIA, M. C. O.; RAZZOLINI, M. T. P. Detection and quantification of viable *Ascaris* sp. and other helminth eggs in sewage sludge. **International Journal of Environment Health Research**, v.23, p.352-362, 2013.

BAUR S, KLAIBER, R.; Hammes W. P., CARLE, R. Sensory and microbiological quality of shredded, packaged iceberg lettuce as affected by pre-washing procedures with chlorinated and ozonated water. **Innov Food Sci Emerg Technol** 5:45-55, 2004.

BERBARI S. A. G., PASCHOALINO, J. E., SILVEIRA, N. F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciênc Tecnol Aliment.** 21:197-201, 2001.

BOUZID, M.; KINTZ, E.; HUNTER, P. R. Risk factors for *Cryptosporidium* infection in low and middle income countries: a systematic review and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 6553-6565, 7 jun. 2018.

BOWMAN, D. D. *Ascaris* and *Toxocara* as foodborne and waterborne pathogens. **Research In Veterinary Science**, [S.L.], v. 135, p. 1-7, mar. 2021.

BRANTSÆTER, A. L.; YDESBOND, T. A.; HOPPIN, J. A.; HAUGEN, M.; MELTZER, H. M. Organic Food in the Diet: exposure and health implications. **Annual Review Of Public Health**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 295-313, 20 mar. 2017.

BRASIL, **Doenças Transmitidas por Alimentos**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doencas-transmitidas-por-alimentos>. Acesso em: 15 jun. 2021.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 357/2005, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acesso em: 21/09/2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação–Sinan: normas e rotinas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO - RDC No 331, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. [Internet]. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO 2019 p. 96.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa IN no 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Brasil; 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL, Resolução RDC n.12 de 02 de janeiro de 2001 - ANVISA/MS. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília - 2001.

BRASIL. Resolução RDC n.14 de 28 de Março de 2014 – ANVISA/MS. Aprova o “Regulamento Técnico que estabelece os requisitos mínimos para de avaliação de matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas e seus limites

de tolerância”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília – 2014, seção 1, P. 58.

CABADA, M. M.; WHITE, A. C. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know?. **Current Opinion In Infectious Diseases**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 494-499, out. 2010

CACCIÒ S. M., BECK, R., LALLE, M. MARINCULIC, A., POZIO, E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. **International Journal for Parasitology** 38, 1523–1531, 2008.

CACCIÒ, S. M.; CHALMERS, R.M. Human cryptosporidiosis in Europe. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 471-480, jun. 2016.

CACCIÒ S. M., GIACOMO, D. M., POZIO, E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. **International Journal for Parasitology** 32, 1023–1030, 2002.

CACCIÒ, S. M.; LALLE, M.; SVÄRD, S. G. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 66, p. 335-345, dez. 2018.

CANTEY, P. T.; ROY, S.; LEE, B.; CRONQUIST, A.; SMITH, K.; LIANG, J.; BEACH, M. J. Study of Nonoutbreak Giardiasis: novel findings and implications for research. **The American Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 124, n. 12, p. 11751-11758, dez. 2011.

CARADONNA, T.; MARANGI, M.; CHIERICO, F. D.; FERRARI, N.; REDDEL, S.; BRACAGLIA, G.; NORMANNO, G.; PUTIGNANI, L.; GIANGASPERO, A. Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 67, p. 67- 75, out. 2017.

CAVALIER-SMITH, T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. **European Journal Of Protistology**, [S.L.], v. 50, n. 5, p. 472-495, out. 2014.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Cryptosporidiosis Summary Report — National Notifiable Diseases Surveillance System, United States, 2018. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2019.

CERTAD, G.; VISCOGLIOSI, E.; CHABÉ, M.; CACCIÒ, S. M. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 33, n. 7, p. 561-576, jul. 2017.

CHAIDEZ, C.; SOTO, M.; GORTARES, P.; MENA, K. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in irrigation water and its impact on the fresh produce industry. **International Journal Of Environmental Health Research**, [S.L.], v. 15, n. 5, p. 339-345, out. 2005.

CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P. Minireview: clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 124, n. 1, p. 138-146, jan. 2010.

CHALMERS, R. M.; DAVIES, A. P.; TYLER, Kevin. *Cryptosporidium*. **Microbiology**, [S.L.], v. 165, n. 5, p. 500-502, 1 maio 2019.

CHALMERS, R. M.; ROBERTSON, L. J.; DORNY, P.; JORDAN, S.; KÄRSSIN, A.; KATZER, F.; LACARBONA, S.; LALLE, M.; LASSEN, B.; MLADINEO, I. Parasite detection in food: current status and future needs for validation. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 99, p. 337-350, maio 2020.

CHAU, H. L. Q.; THONG, H. T.; VAN CHAO, N.; HUNG, P. H. S.; VAN HAI, V.; VAN AN, L.; FUJIEDA, A.; UERU, T.; AKAMATSU, M.. Microbial and Parasitic Contamination on Fresh Vegetables Sold in Traditional Markets in Hue City, Vietnam. **Journal Of Food And Nutrition Research**, [S.L.], v. 2, n. 12, p. 959-964, 18 nov. 2014.

CHÁVEZ-RUVALCABA, F.; CHÁVEZ-RUVALCABA, M. I.; SANTIBAÑEZ, K. M.; MUÑOZ-CARRILLO, J. L.; CORIA, A. L.; MARTÍNEZ, R. R. Foodborne Parasitic Diseases in the Neotropics – a review. **Helminthologia**, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 119-133, 1 jun. 2021.

CHECKLEY, W.; WHITE, A C.; JAGANATH, D.; ARROWOOD, M. J.; CHALMERS, R. M.; CHEN, X. M.; FAYER R.; GRIFFITHS, J. K.; GUERRANT, R. L.; HEDSTROM, L. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *cryptosporidium*. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 85-94, jan. 2015.

CHEN X-M, KEITHLY, J. S., PAYA, C. V., LARUSSO, N. F. Cryptosporidiosis. **New England Journal of Medicine**, 346(22), 1723–1731, 2002.

CLODE, P. L.; KOH, W. H.; THOMPSON, R.C. A. Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*?. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 31, n. 12, p. 614-624, dez. 2015.

CODEX Alimentarius. Higiene dos alimentos: textos básicos. Brasília: Organização PanAmericana da Saúde, 2006. Disponível em: https://acisat.pt/wp-content/uploads/2016/10/codex_alimentarius.pdf. Acesso em: 15 jun. 2021.

COELHO, C. H.; DURIGAN, M.; LEAL, D. A. G.; SCHNEIDER, A. D. B.; FRANCO, R. M. B.; SINGER, S. M. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: systematic review of 20 years of publications. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 6005-6027, 24 out. 2017.

COELHO, L. M. P. S.; OLIVEIRA, S. M.; MILMAN, M. H. S. A.; KARASAWA, K., A., SANTOS, R. P. Detecção de formas transmissíveis de enteroparasitas na água e nas hortaliças consumidas em comunidades escolares de Sorocaba, São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 34, n. 5, p. 479-482, out. 2001.

COOK, N.; NICHOLS, R. A. B.; WILKINSON, N.; PATON, C. A.; BARKER, K.; SMITH, H. V. Development of a Method for Detection of *Giardia duodenalis* Cysts on Lettuce and for Simultaneous Analysis of Salad Products for the Presence of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 73, n. 22, p. 7388-7391, 15 nov. 2007.

COOK, N.; PATON, C.A.; WILKINSON, N.; NICHOLS, R.A.B.; BARKER, K.; SMITH, H.V.. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: development and optimization of methods. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 109, n. 3, p. 215-221, jun. 2006.

COLLI, C.M., BEZAGIO, R.C., NISH, L., BIGNOTTO, T.S., FERREIRA, É.C., FALAVIGNA-GUILHERME, A.L., GOMES, M.L., 2015a. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in southern Brazil indicates a relationship among them. **PLoS One**, [S.L.], v. 10, n.3, p. 1-12, 2015.

COLLI, C.M., BEZAGIO, R.C., NISHI, L., FERREIRA, É.C., FALAVIGNA-GUILHERME, A.L., GOMES, M.L. Food handlers as a link in the chain of transmission of *Giardia duodenalis* and other protozoa in public schools in southern Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 109, 601-603, 2015.

CORSO, P. S.; KRAMER, M. H.; BLAIR, K. A.; ADDISS, D. G.; DAVIS, J. P.; HADDIX, A. C. Costs of Illness in the 1993 Waterborne *Cryptosporidium* Outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 426-431, abr. 2003.

COTTON, J. A.; BEATTY, J. K.; BURET, A. G. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 41, n. 9, p. 925-933, ago. 2011.

DIXON, B. R. *Giardia duodenalis* in humans and animals – Transmission and disease. **Research In Veterinary Science**, [S.L.], v. 135, p. 283-289, mar. 2021.

DIXON, B.; PARRINGTON, L.; COOK, A.; POLLARI, F.; FARBER, J. Detection of *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in Ready-to-Eat Packaged Leafy Greens in Ontario, Canada. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 76, n. 2, p. 307-313, 1 fev. 2013.

DUEDU, K., YARNIE, E. A., TETTEH-QUARCOO, P. B., ATTAH, S. K., DONKOR, E. S. AYEH-KUMI, P. F. A comparative survey of the prevalence of human parasites found in fresh vegetables sold in supermarkets and open-aired markets in Accra, Ghana. **Bmc Research Notes**, Accra, Ghana, v. 836, n. 7, p.1-6, 2014.

DUMETRE, A., AUBERT, D., PUECH, P. H., HOHWYER, J., AZAS, N. VILLENA, I. Interaction Forces Drive the Environmental Transmission of Pathogenic Protozoa. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 78, n. 4, p.905-912, 9 dez. 2011.

EFSA (European Food Safety Authority), Bronzwaer, S., Kass, G., Robinson, T., Tarazona, J., Verhagen, H., et al. (2019). Editorial on food safety regulatory research needs 2030. **EFSA Journal**, 17(7), Article e170622. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.e170622>. Acesso em: 17. Set. 2020.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J. E.; KARANIS, P. Waterborn transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2011 - 2016. **Water Research**, [S.L.], v. 114, p. 14-22, maio 2017.

EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. Evolution of monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. **Water Research**, [S.L.], v. 123, p. 96-112, out. 2017.

EINARSSON, E.; MA' AYE, S.; SVÄRD, S. G. An up-date on *Giardia* and giardiasis. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 34, p. 47-52, dez. 2016.

EPA, US Environmental Protection Agency 2002. *National Water Quality Inventory: 2000 Report*. Washington (DC): EPA Office of Water. Report no. EPA841-R-02-001.

ERAKY, M. A.; RASHED, S. M.; NASR, M. E. S.; EL-HAMSHARY, A. M. S.; EL-GHANNAM, A. S. Parasitic Contamination of Commonly Consumed Fresh Leafy Vegetables in Benha, Egypt. **Journal Of Parasitology Research**, [S.L.], v. 2014, p. 1-7, 2014.

ESCOBEDO, A. A.; ALMIRALL, P.; ALFONSO, M.; CIMERMAN, S.; CHACÍN-BONILLA, L. Sexual transmission of giardiasis: a neglected route of spread?. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 132, p. 106-111, abr. 2014.

FALLAH, A. A., PIRALI-KHEIRABADIB, K., SHIRVANID, F., SAEI-DEHKORDIA, S. S. Prevalence of parasitic contamination in vegetables used for raw consumption in Shahrekord, Iran: Influence of season and washing procedure. **Food Control**: v. 25, n. 2, p. 617-620, 2012.

FANTINATTI, M.; LOPES-OLIVEIRA, L. A. P.; CASCAIS-FIGUEREDO, T.; AUSTRIACO-TEIXEIRA, P.; VERISSIMO, E.; BELLO, A. R.; DA-CRUZ, A. M. Recirculation of *Giardia lamblia* Assemblage A After Metronidazole Treatment in an Area With Assemblages A, B, and E Sympatric Circulation. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1-9, 22 out. 2020.

FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. 2014. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. Microbiological Risk Assessment Series No. 23. Rome. 302pp.

FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. 1999. Disponível em: https://www.fao.org/waicent/ois/press_ne/presseng/1999/pren9940.htm. Acesso em: 01. Jul. 2021.

FAO/WHO/AU, 2019. **The future of food safety – Transforming knowledge into action for people, economies and the environment**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/events/international-food-safety-conference>. Acesso em: 20 jun. 2021.

FAO, F statistical yearbook 2013 world food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 307, 2013.

FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. 2014. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. Microbiological Risk Assessment Series No. 23. Rome. 302pp.

FAOUR-KLINGBEIL, D.; TODD, E. C. D. Prevention and Control of Foodborne Diseases in Middle-East North African Countries: review of national control systems. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 70, 20 dez. 2019.

FAYER, R.; GRACZYK, T. K., LEWIS, E. J., TROUT, J. M., & FARLEY, C. A. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 3, p. 1070-1074, 1998.

FAYER R, UNGAR, B. L. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. **Microbiol Rev**, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 458-483, 1986.

FAYER R. Xiao L. 2007 *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. **CRC Press M12**, pp. 25–576.

FAYER, R.; SPEER, C. A. DUBEY, J. P. The general biology of *Cryptosporidium*. In: FAYER, R. (Ed.) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC press, ed. Boca Raton. Florida, 1997. p. 1-42.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 126, n. 1-2, p. 37-56, dez. 2004.

(FDA), Department Of Health And Human Services And The Food And Drug Administration. How Did FDA Establish Requirements for Water Quality and Testing of Irrigation Water under the FSMA Final Rule for Produce Safety. 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/food-safety-modernization-act-fsma/fsma-final-rule-produce-safety>. Acesso em: 03 jun. 2021.

FENG Y. RYAN U. XIAO L. Genetic diversity and population structure of *Cryptosporidium*. **Trends Parasitol**, v. 34, n. 11, p. 997–1011, 2018.

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.

FERREIRA, F. P.; CALDART, E. T.; FREIRE, R. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; FREITAS, F. M.; MIURA, A. C.; MAREZE, M.; MARTINS, F. D. C.; URBANO, M. R.; SEIFERT, A. L. The effect of water source and soil supplementation on parasite contamination in organic vegetable gardens. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 327-337, 30 ago. 2018.

FERRY, T., BOUHOUB, D., DE MONBRISON, F., LAURENT, F., DUMOUCHEL-CHAMPAGNE, H., PICOT, S., PIENS, M.A., GRANIER, P. Severe peritonitis due to *Balantidium coli* acquired in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* v. 23, n. 5, p. 393–395, 2004.

FIGATT, M., MERGEN, K., KIMELSTEIN, D., MAHONEY, D.M., NEWMAN, A., NICJOLAS, D., RICUPERO, K., CAFIERO, T., CORRY, D., ADE, J., KURPIEL, P., MADISON-ANTENUCCI, S., ANAND, M. Giardiasis Outbreak Associated with Asymptomatic Food Handlers in New York State, 2015. *J. Food Prot.* v. 80, n. 5, p. 837-841, 2017.

FINK, M. Y.; SINGER, S. M. The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. *Trends In Parasitology*, [S.L.], v. 33, n. 11, p. 901-913, nov. 2017.

FRANCO, R. M. B.; 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*, v. 43, n. 2, p. 109-111, 2001.

FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; LEAL, D. A. G. PARASITOLOGIA AMBIENTAL: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. *Revista de Patologia Tropical*, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 119-135, 12 jul. 2012.

FRANCO, R. M. B.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts in Bottled Mineral Water Commercialized in the City of Campinas, State of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, [S.L.], v. 97, n. 2, p. 205-207, mar. 2002.

GABRE, R. M.; SHAKIR, A. Prevalence of some human enteroparasites in commonly consumed raw vegetables in Tabuk, Saudi Arabia. *Journal of Food Protection*, v. 79, n. 4. p. 655-658, 2016.

GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016; 388: 1459–544.

GIANGASPERO, A., MARANGI, M., KOEHLER, A. V. PAPINI, R. Molecular detection of Cyclospora in water, soil, vegetables and humans in southern Italy signals a need for improved monitoring by health authorities. *International Journal Of Food Microbiology*, Foggia, Italy, v. 211, p.95-100, out. 2015.

GIESSEN, J. V. D.; DEKSNE, G.; GÓMEZ-MORALES, M. A.; TROELL, K.; GOMES, J.; SOTIRAKI, S.; ROZYCKI, M.; KUCSERA, I.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; ROBERTSON, LUCY, J. Surveillance of foodborne parasitic diseases in Europe in a One Health approach. **Parasite Epidemiology And Control**, [S.L.], v. 13, p. 205-2015, maio 2021.

GIRONES, R., FERRUS, M. A., ALONSO, J. L., RODRIGUEZ-MANZANO, J., CALGUA, B., DE ABREU CORREA, A., BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens in water—the pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, v. 44, n. 15, p. 4325-4339, 2010.

HINOJOSA, P. G., ESPINOZA-RIOS, J., RONQUILLO, C. A., VALDIVIA, J. L. P. DUENAS, Y. S., MORALES, W. Z. Balantidiasis colónica: reporte de un caso fatal y revisión de la literatura. *Rev. Gastroenterol. del Peru*, v. 39, n. 3, p. 284–287, 2019.

GRAZIOLI, B. *Giardia lamblia* infection in patients with irritable bowel syndrome and dyspepsia: a prospective study. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 12, n. 12, p. 1941, 2006.

GUPTA, N.; KHAN, D.K.; SANTRA, S.C. Prevalence of intestinal helminth eggs on vegetables grown in wastewater-irrigated areas of Titagarh, West Bengal, India. **Food Control**, [S.L.], v. 20, n. 10, p. 942-945, out. 2009.

HAJIPOUR, N.; SOLTANI, M.; KETZIS, J.; HASSANZADEH, P. Zoonotic parasitic organisms on vegetables: impact of production system characteristics on presence, prevalence on vegetables in northwestern iran and washing methods for removal. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 95, p. 103704-103712, maio 2021.

HALLIEZ, M. C., BURET, A. G. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 19, n. 47, p. 8974-8985, 2013.

HASSAN, E. M.; ÖRMECI, B.; DEROSA, M. C.; DIXON, B. R.; SATTAR, S. A.; IQBAL, A. A review of *Cryptosporidium* spp. and their detection in water. **Water Science And Technology**, [S.L.], v. 83, n. 1, p. 1-25, 28 out. 2020.

HELLER, L.; BASTOS, R.K.X.; VIEIRA, M.B.C.M.; BEVILACQUA, P.D.; BRITO, L.L.A.; MOTA, S.M.M.; OLIVEIRA, A.A.; MACHADO, P.M.; SALVADOR, D.P.; CARDOSO, A.B. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.13, n. 2, p. 79-92, 2004.

HEYWORTH, M.F. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. **Parasite**, v. 23, n. 13, p. 1-5, 2016.

HIJJAWI, N.S.; MELONI, B.P.; RYAN, U.M.; OLSON, M.E.; THOMPSON, R.C.A. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 32, n. 14, p. 1719-1726, dez. 2002.

HOANG, H.A.; QUY, N.T.C.; CHI, N.V.T. Detection of *Escherichia coli* in ready-to-eat fresh vegetables using broad-host-range recombinant phages. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 124, n. 6, p. 1610-1616, 25 mar. 2018.

HOLUBOYA, N., ZIKMUNDIVÁ, V. LIMPOUCHOVÁ, Z. B., KONECNY, R., HLÁSKOVÁ, L., RAISKY, D., KOPACZ, Z., MCEVOY, J., KVAC, M. *Cryptosporidium proventriculi* sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. **Eur. J. Protistol.** V. 69, p. 70–87, 2019.

HOMAN WL, MANK TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. **Int J Parasitol.** v. 31, n. 8, p. 822–826, 2001.

HOPKINS R. M., MELONI, B. P., GROTH, D. M., WETHERALL, J. D., REYNOLDSON, J. A., THOMPSON, R. C. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia isolates* recovered from humans and dogs living in the same locality. **J Parasitol.** v.83, n. 1, p. 44-51, 1997.

HUANG, D. B.; WHITE, A. Clinton. An Updated Review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Gastroenterology Clinics Of North America**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 291-314, jun. 2006.

HURTADO-BARROSO, S., TRESSERRA-RIMBAU, A., VALLVERDÚ-QUERSLT, A., LAMUELA-RAVENTÓS, A. Organic food and the impact on human health. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 704-714, 30 nov. 2017.

IAASTD (2009). Agriculture at a Crossroads. International Assessment of Agricultural Knowledge, Science and Technology for Development, Sub-Saharan Africa (SSA) Report. ISBN 978-1-59726-538-6.iaa

IBRD-IDA, The World Bank. **Food-borne Illnesses Cost US\$ 110 Billion Per Year in Low - and Middle-Income Countries.** 2018. Disponível em: <https://www.worldbank.org/en/news/press-release/2018/10/23/food-borne-illnesses->

cost-us-110-billion-per-year-in-low-and-middle-income-countries. Acesso em: 28 jun. 2021.

IGLESIAS-OSORES, S.; FAILOC-ROJAS, V. *Iodamoeba bütschlii*. **Revista Chilena de Infectología**, [S.L.], v. 35, n. 6, p. 669-670, 2018.

IMRE, K.; MORAR, A.; ILIE, M. S.; PLUTZER, J.; IMRE, M., EMIL, T.; HERBEI, M. V.; DĂRĂBUȘ, G. Survey of the Occurrence and Human Infective Potential of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in Wastewater and Different Surface Water Sources of Western Romania. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, [S.L.], v. 17, n. 10, p. 685-691, out. 2017.

LIMA, S. Kitakawa, GALIZA, M., VALADARES, A., ALVES, F. Produção e consumo de produtos orgânicos no mundo e no Brasil. Brasília, DF: IPEA, 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Plano de ação para a eliminação de doenças infecciosas negligenciadas e pós eliminação 2016-2022. 2016. 68ª Sessão do Comitê Regional da OMS para as Américas, Washington, D.C., EUA, 26 a 30 de setembro de 2016. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/31434>. Acesso em: 30 Ago. 2021.

ISHII, S.; SADOWSKY, M. J. *Escherichia coli* in the Environment: implications for water quality and human health. **Microbes And Environments**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 101-108, 2008.

JABIONSKA-TRYPUC, A., WOLEJKO, W., WYDRO, U., BUTAREWICZ, A. The impact of pesticides on oxidative stress level in human organism and their activity as an endocrine disruptor. **Journal Of Environmental Science And Health, Part B**, [S. L.], v. 52, n. 7, p. 483-494, 25 maio 2017.

JAKUBOWSKI, W.; BOUTROS, S.; FABER, W.; FAYER, R.; GHIORSE, W.; LECHEVALLIER, M.; ROSE, J.; SCHAUB, S.; SINGH, A.; STEWART, M. Environmental methods for *Cryptosporidium*. **Journal - American Water Works Association**, [S.L.], v. 88, n. 9, p. 107-121, set. 1996.

JANG, J.; HUR, H.-G.; SADOWSKY, M.J.; BYAPPANAHALLI, M.N.; YAN, T.; ISHII, S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 123, n. 3, p. 570-581, 3 jul. 2017.

JAVANMARD, E., MIRJALALI, H., NIYYATI, M., SHARIFDINI, M., JALILZADEH, E., TABAEI, S. J. S., AGHDAEI, H. A., ROSTAMI, R., NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD, E., HAGHIGHI, A., ZALI, M. R. Small-scale risk assessment of

transmission of parasites from wastewater treatment plant to downstream vegetable farms. **Gastroenterology And Hepatology From Bed To Bench** , Tehran, Iran, v. 4, n. 11, p.352-358, 2018.

J.HOTEZ, P. Human Parasitology and Parasitic Diseases: Heading Towards 2050. **Adv Parasitol**, [S. L.], v. 29, n. 100, p. 29-38, 2018.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal Of Water And Health**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-38, 1 set. 2006.

KARUNARATHNE, A., GUNNELL, D., KONRADSEN, F., EDDLESTON, M. How many premature deaths from pesticide suicide have occurred since the agricultural Green Revolution? **Clinical Toxicology**, [S.L.], v. 58, n. 4, p. 227-232, 9 set. 2019.

KIFLEYOHANNES, T.; ROBERTSON, L. J. Preliminary insights regarding water as a transmission vehicle for *Cryptosporidium* and *Giardia* in Tigray, Ethiopia. **Food and Waterborne Parasitology**, p. e00073, 2020.

KIM, KI-HYUN et al. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 575, p. 525-535, jan. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896971631926X?via%3Dihub>.

KLAPEC, T., BORECKA, A. Contamination of vegetables. fruits and soil with geohelminths eggs con organic farm in Poland. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 19, n. 3, p. 421-425, 2012.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal Of Molecular Evolution**, [S. L.], v. 16, n. 2, p. 111-120, jun. 1980.

KING, P.; TYLER, K. M.; HUNTER, P. R. Anthroponotic transmission of *Cryptosporidium parvum* predominates in countries with poorer sanitation: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 2-13, 8 jan. 2019.
KOEHLER, A. V.; JEX, A. R.; HAYDON, S. R.; STEVENS, M. A.; GASSER, R. B. *Giardia*/giardiasis — A perspective on diagnostic and analytical tools. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 280-289, mar. 2014.

KOPACZ, Ż.; KVÁČ, M.; KARPIŃSKI, P.; HENDRICH, A. B.; SĄSIĄDEK, M. M.; LESZCZYŃSKI, P.; SAK, B.; MCEVOY, J.; KICIA, M. The First Evidence of *Cryptosporidium meleagridis* Infection in a Colon Adenocarcinoma From an

Immunocompetent Patient. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 9, p. 1-5, 4 mar. 2019.

KOTHAVADE, R. J. Challenges in understanding the immunopathogenesis of *Cryptosporidium* infections in humans. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [S.L.], v. 30, n. 12, p. 1461-1472, 12 abr. 2011.

KOTLOFF, K. L.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C.; NASRIN, D.; FARAG, T. H.; PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S. O.; SUR, D.; BREIMAN, R. F. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, [S.L.], v. 382, n. 9888, p. 209-222, jul. 2013.

KRIWY, P.; MECKING, R. A. Health and environmental consciousness, costs of behaviour and the purchase of organic food. **International Journal Of Consumer Studies**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 30-37, 26 maio 2011.

KUMAR, T.; MAJID, M. A. A.; ONICHANDRAN, S.; JATURAS, N.; ANDIAPPAN, H.; SALIBAY, C. C.; TABO, H. A. L.; TABO, N.; DUNGCA, J. Z.; TANGPONG, Jitbanjong. Presence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water samples from Southeast Asia: towards an integrated water detection system. **Infectious Diseases Of Poverty**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 2-12, 13 jan. 2016.

LALLE M, P. E., CAPELLI, G., BRUSCHI, F., CROTTI, D., CACCIÒ, S. M. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 207–213, 2005.

LALLE, M.; BRUSCHI, F.; CASTAGNA, B.; CAMPA, M.; POZIO, E.; CACCIÒ, S. M. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 103, n. 8, p. 834-838, ago. 2009.

LEAL, D. A. G.; BONATTI, T. R.; LIMA, BARBOSA, LABELLO, R., FRANCO, R. M. B. **Detection of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Edible Shellfish: Choosing a Target.** Ed. Marciane magnai. Estados Unidos: Springer Nature, 2021. 10 p.

LEAL, D. A. G.; PEREIRA, M. A.; FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; NETO, R. C. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil. **Journal Of Water And Health**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 527-532, 1 mar. 2008.

LEAL, D. A. G.; SOUZA, MARQUES, D. S.; CAUMO, K. S.; FONGARO, G.; PANATIERI, L. F.; DURIGAN, M.; ROTT, M. B.; BARARDI, C. R. M.; FRANCO, R. M. B. Genotypic characterization and assessment of infectivity of human waterborne pathogens recovered from oysters and estuarine waters in Brazil. **Water Research**, [S.L.], v. 137, p. 273-280, jun. 2018.

LECHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D. Examining Relationships Between Particle Counts and *Giardia*, *Cryptosporidium*, and Turbidity. **American Water Works Association**, [S.L.], v. 84, n. 12, p. 54-60, dez. 1992.

LEUNG, A. K. C.; LEUNG, A. A. M.; WONG, A. H. C.; SERGI, C. M.; KAM, J. K. M. Giardiasis: an overview. **Recent Patents On Inflammation & Allergy Drug Discovery**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 134-143, 4 dez. 2019.

LIGDA, P; CLAEREBOUT, E.; KOSTOPOULOU, D.; ZDRAGAS, A.; CASAERT, S.; ROBERTSON, L. J.; SOTIRAKI, S. *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water and drinking water: animal sources and towards the use of a machine-learning approach as a tool for predicting contamination. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 264, p. 114766, set. 2020.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, [S.L.], v. 42, n. 117, p. 518-534, jun. 2018.

LOPEZ-GÁLVEZ F., ALLENDE, A., TRUCHADO, P., MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A., TUDELA, J A., SELMA, M.V., GIL, M.I. **Postharvest Biol Technol**, v. 55, n. 1, p. 53-60, 2010.

LOTTER, D.W.; SEIDEL, R.; LIEBHARDT, W. The performance of organic and conventional cropping systems in an extreme climate year. **American Journal Of Alternative Agriculture**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 146-154, set. 2003.

LUCY, F.; CONNOLLY, M.; GRACZYK, T.; TAMANG, L.; SULLIVAN, M.; MASTITSKY, S. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) are effective sentinels of water quality irrespective of their size. **Aquatic Invasions**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 49-57, 2010.

LYU, Z.; SHAO, J.; XUE, M.; YE, Q.; CHEN, B.; QIN, Y.; WEN, J. A new species of *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcomastigophora: hexamitidae) in hamsters. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 2-8, 20 mar. 2018.

MACARISIN, D.; BAUCHAN, G.; FAYER, R. *Spinacia oleracea* L. leaf stomata harboring *Cryptosporidium parvum* oocysts: a potential threat to food safety. **Appl Environ Microbiol**, [S.L], v. 2, n. 76, p. 555-559, 2010.

MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIR, K. A.; PETERSON, D. E.; KAZMIERCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. B. A Massive Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* Infection Transmitted through the Public Water Supply. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 331, n. 3, p. 161-167, 21 jul. 1994.

MAHDY, A. K. M., JOHARI, S., WAN, K. L., MOHD-ADNAN, A., AL-MEKHLAFI, M. S. H. LIM, Y. A. L. *Giardia intestinalis* genotypes: risk factors and correlation with clinical symptoms. **Acta Trop.** v. 112, n. 1, p. 67–70, 2009.

MALDONADE, I. R.; GINANI, V. C.; RIQUETTE, R. F. R.; GURGEL-GONÇALVES, R.; MENDES, V. S.; MACHADO, E. R. Good manufacturing practices of minimally processed vegetables reduce contamination with pathogenic microorganisms. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v. 61, p. 1-9, 2019.

MAMEDOVA, S.; KARANIS, P. *Cryptosporidium* spp. infections in livestock and wild animals in Azerbaijan territory. **Journal Of Water And Health**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 545-562, 26 maio 2021.

MARCHIORO, A. A.; TIYO, B. T.; COLLI, C. M.; SOUZA, C. Z.; GARCIA, J. L.; GOMES, M. L.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. First Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the Fresh Leafs of Vegetables in South America. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, [S.L.], v. 16, n. 9, p. 624-626, set. 2016.

MATOSINHOS F. C., VALENZUELA, V. C., SILVEIRA, J. A., RABELO, E. M. Standardization of a method for the detection of helminth eggs and larvae in lettuce. **Parasitol Res**, v. 115, n. 5, p. 1827–1834, 2016.

MCKERR, C; ADAK, G. K.; NICHOLS, G.; GORTON, R.; CHALMERS, R. M.; KAFATOS, G.; COSFORD, P.; CHARLETT, A.; REACHER, M.; POLLOCK, K. G. An Outbreak of *Cryptosporidium parvum* across England & Scotland Associated with Consumption of Fresh Pre-Cut Salad Leaves, May 2012. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 0125955, 27 maio 2015.

ISO 18744:2016, Microbiology of the Food Chain - Detection and Enumeration of *Cryptosporidium* And *Giardia* in Fresh Leafy green Vegetables and berry Fruits, <https://www.iso.org/standard/63252.html>.

MOHAMED, M. A.; SIDDIG, E. E.; ELAAGIP, A. H.; EDRIS, A. M. M.; NASR, A. A. Parasitic contamination of fresh vegetables sold at central markets in Khartoum state, Sudan. **Annals Of Clinical Microbiology And Antimicrobials**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 2-7, 11 mar. 2016.

MORENO, Y., MORENO-MESORENO, L., AMORÓS, L., PÉREZ, R., MORILLO, J. A., ALONSO, J. L. Multiple identification of most important waterborne protozoa in surface water used for irrigation purposes by 18S rRNA amplicon-based metagenomics. **International Journal Of Hygiene And Environmental Health**, [S.L.], v. 221, n. 1, p. 102-111, jan. 2018.

MORGAN, U., XIAO, L, LIMOR, J., GELIS, S., RAIDAL, S. R., FAYER, R., LAL, A., ELLIOT, A., THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-necked parrot (*Psittacula krameri*). **Aust Vet J**. v. 78, n. 3, p. 182-183, 2000.

MULLER, A; SCHADER, C; SCIALABBA, N. E. H.; BRÜGGEMANN, J.; ISENSEE, A.; ERB, K. H.; SMITH, P.; KLOCKE, P.; LEIBER, F.; STOLZE. Strategies for feeding the world more sustainably with organic agriculture. **Nature Communications**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-13, 14 nov. 2017.

NEVES, P. D. M.; BELLINI, M. Intoxicações por agrotóxicos na mesorregião norte central paranaense, Brasil - 2002 a 2011. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 3147-3156, nov. 2013.

Nichols, G, Thom, BT. Food poisoning caused by *Cryptosporidium*: a load of tripe. PHLS Communicable Disease Surveillance Centre, London, 1985.

NISHI, L., BERGAMASCO, R., TOLEDO, M. J. D. O., FALAVIGNA, D. L. M., GOMES, M. L., MOTA, L. T., FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in the Ivaí indigenous land, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 5, p. 543-547, 2009.

O'CONNOR, ROBERTA, M.; WANYIRI, JANE, W.; CEVALLOS, A. M.; PRIEST, J. W.; WARD, H. D. *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. **Molecular And Biochemical Parasitology**, [S.L.], v. 156, n. 1, p. 80-83, nov. 2007.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil: i - pesquisa de helmintos. **Revista de Saúde Pública**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 283-289, ago. 1992.

OKULEWICZ, A, ZLOTORZYCKA, J. *Toxocara canis* (Nematoda) oraz toksokarozy zwierząt i człowieka. *Wiad Parazytol.* v. 43, n. 1, p. 3-25, 1997.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Plano de ação para a eliminação de doenças infecciosas negligenciadas e pós eliminação 2016-2022. 2016. 68ª Sessão do Comitê Regional da OMS para as Américas, Washington, D.C., EUA, 26 a 30 de setembro de 2016. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/31434>. Acesso em: 30 ago. 2021.

ORTEGA-PIERRES, M. G.; JEX, A. R.; ANSELL, B. R. E., SVÄRD, S. G. Recent advances in the genomic and molecular biology of *Giardia*. *Acta Tropica*, [S.L.], v. 184, p. 67-72, ago. 2018.

PAKIANATHAN M. R., MCMILLAN, A. Intestinal protozoa in homosexual men in Edinburgh. *Int J STD AIDS*. v. 10, n. 12, p. 780-784, 1999.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Plan of Action for the Elimination of Neglected Infectious Diseases and Post-elimination Actions 2016-2022**, 2016. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/31434>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

Pan American Health Organization. Tools for monitoring the coverage of integrated public health interventions. Vaccination and deworming of soil-transmitted helminthiasis. Washington, D.C.: PAHO; 2017.

PANARO, M. A.; CIANCIULLI, A.; MITOLO, V.; MITOLO, C. I.; ACQUAFREDDA, A.; BRANDONISIO, O.; CAVALLO, P. Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. *Fems Immunology & Medical Microbiology*, [S.L.], v. 51, n. 2, p. 302-309, nov. 2007.

PARUCH, A. M.; MÆHLUM, T.; ROBERTSON, L. Changes in Microbial Quality of Irrigation Water Under Different Weather Conditions in Southeast Norway. *Environmental Processes*, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 115-124, 19 dez. 2014.

PICKERING, LARRY, K.; ENGELKIRK, P. G. *Giardia lamblia*. *Pediatric Clinics Of North America*, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 565-577, jun. 1988.

PEZZIN, J.; AMBROZIM, F. M.; SOUZA, M. A. A.; GRADELLA, D. B. T. Enteroparasites in vegetables marketed in an ancient Brazilian city. *Revista de Salud Pública*, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 635-640, 1 set. 2017.

PILOTTE, N.; MAASCH, J. R. M. A.; EASTON, A. V.; DAHLSTROM, E.; NUTMAN, T. B.; WILLIAMS, S. A. Targeting a highly repeated germline DNA sequence for improved real-time PCR-based detection of *Ascaris* infection in human stool. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 0007593, 22 jul. 2019.

PIMENTEL, D. Green revolution agriculture and chemical hazards. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 188, p. 86-98, set. 1996.

PINEDA, C. O.; LEAL, D. A. G.; FIUZA, V. R. S.; JOSE, J.; BORELLI, G.; DURIGAN, M.; PENA, H. F. J.; FRANCO, R. M. B. *Toxoplasma gondii* oocysts, *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in outdoor swimming pools in Brazil. **Zoonoses And Public Health**, [S.L.], v. 67, n. 7, p. 785-795, 8 ago. 2020.

PINEDA, C. O.; LEAL, D. A. G.; LIMA, R.; RIBEIRO, P. P.; RODRIGUES, A.; MARTINI, M. H.; STANCARI, R. C. A., MATOSINHOS, F. C. L., MINÉ, J. C.; GREINERT-GOULART, J. A. Parasites in Fresh Produce: a brazilian inter-laboratory evaluation of a standardized methodology for the detection of ascaris sp. in leafy vegetables. **Food Analytical Methods**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 989-996, 6 jan. 2021.

PINGALI, P. L. Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, Cambridge, Ma, v. 109, n. 31, p. 12302-12308, 2012.

PLUTZER, J., TOMOR, B. The role of aquatic birds in the environmental dissemination of human pathogenic *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Hungary. **Parasitology International**, v. 58, n. 2, p. 227–231, 2009.

PONCE-GORDO, F.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. J. *Balantioides coli*. **Research In Veterinary Science**, [S.L.], v. 135, p. 424-431, mar. 2021.

POPP, J. P. K.; NAGY, J. Pesticide productivity and food security. A review. **Agronomy For Sustainable Development**, Hungary, v. 33, n. 1, p. 243-245, 2013.

PUNSAWAD, C.; PHASUK, N.; THONGTUP, K.; NAGAVIROCHANA, S.; VIRIYAVEJAKUL, P. Prevalence of parasitic contamination of raw vegetables in Nakhon Si Thammarat province, southern Thailand. **Bmc Public Health**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 2-7, 8 jan. 2019.

RAFAEL, K.; A MARCHIORO, A.; COLLI, C. M.; TIYO, B. T.; EVANGELISTA, F. F.; BEZAGIO, R. C.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. 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. **Transactions**

Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene, [S.L.], v. 111, n. 12, p. 540-545, 1 dez. 2017.

RAZAK, M. A.; BEGUM, P. S.; VISWANATH, B.; RAJAGOPAL, S. Multifarious Beneficial Effect of Nonessential Amino Acid, Glycine: a review. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2017, p. 1-8, 2017.

REGANOLD, J. P., WACHTER, J. M. Organic agriculture in the twenty-first century. **Nature Plants**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 1-8, fev. 2016.

RELAT, R. M. B.; O'CONNOR, R. M. *Cryptosporidium*: host and parasite transcriptome in infection. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 58, p. 138-145, dez. 2020.

RENDTORFF, R. C. The Experimental Transmission of Human Intestinal Protozoan Parasites. **American Journal Of Epidemiology**, [S.L.], v. 59, n. 2, p. 209-222, mar. 1954.

ROBERTSON, L. J.; CHALMERS, R. M. Foodborne cryptosporidiosis: is there really more in nordic countries? **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 3-9, jan. 2013.

ROBERTSON, L. J. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. **International journal of Food Microbiology**. v. 120, n. 3, p. 201-216, 2007.

ROBERTSON, L. J. Parasites in Food: from a neglected position to an emerging issue. **Biological Emerging Risks In Foods**, [S.L.], v. 86, p. 71-113, 2018.

ROSADO-GARCÍA, F. M. GUERRERO-FLÓREZ, M., KARANIS, G., HINOJOSA, M. D. C., & KARANIS, P. Water-borne protozoa parasites: the Latin American perspective. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 220, n. 5, p. 783-798, 2017.

ROXSTRÖM-LINDQUIST, K., PALM, D.; REINER, D.; RINGQVIST, E.; SVÄRD, S. G. *Giardia* immunity – an update. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 26-31, jan. 2006.

RUSIÑOL, M., HUNDESA, A., CARDENAS-YOUNGS, Y., FERNANDEZ-BRAVO, A., PÉREZ-CATALUÑA, A., MORENO-MESONERO, L., MORENO Y., CALVO, M., ALONSO, J. L., FIGUERAS, M. J., ARAUJO, R., BOFILL-MAS, S., GIRONES, R. Microbiological contamination of conventional and reclaimed irrigation water: evaluation

and management measures. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 710, p. 136298-136308, mar. 2020.

RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International journal for parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 943-956, 2013.

RYAN, U., HIJJAWI, N., XIAO, L. Foodborne cryptosporidiosis. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 1-12, jan. 2018.

RYAN, U., HIJJAWI, N., FENG, Y., XIAO, L. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 1-11, jan. 2019.

RYAN, U.; PAPANINI, A.; MONIS, P.; HIJJAWI, N. It's official – *Cryptosporidium* is a greengrass: what are the implications for the water industry? **Water Research**, [S.L.], v. 105, p. 305-313, nov. 2016.

RYAN, U., FAYER, R., XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, [S.L.], v. 141, n. 13, p. 1667-1685, 11 ago. 2014.

SADOWSKA, N., TOMZA-MARCINIAK, A., JUSZCZAK, M. Soil contamination with geohelminths in children's play areas in Szczecin, Poland. **Polish Parasitological Society, Szczecin**, Poland, v. 1, n. 65, p.65-70, 2019.

SAID, D. E. S. Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. **Alexandria Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 48, n. 4, p. 345-352, 1 dez. 2012.

SAIFI ES, G. A., SPANDRIO, S. Giardiasis and subsequent diagnosis of HIV infection in a patient with persistent diarrhoea: A case report. **Infez Med**, v. 26, n. 1, p. 89-92, 2018.

SAKKAS, H., ECONOMOU, V., BOZIDIS, P., GOUSIA, P., PAPADOPOULOU, C., KARANIS, P. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in foods of plant origin in North-Western Greece. **Journal Of Water And Health**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 574-578, 10 jun. 2020.

SANTOS, J. S., KUBA, C. A., SANTOS, F. A. G.; BATISTA, A. S., SITOLINO, S. C. P., PEREIRA, A. C. C., GIUFFRIDA, R., SANTARÉM, V. A. Parasitological analysis of green leaf lettuce cultivated in different production systems. **Semina: Ciências Agrárias**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 801, 2 maio 2017.

SANTOS, T. B. A., NEUSELY, S., JUNQUEIRA, V. C. A., PEREIRA, J. L. Microrganismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processadas. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [S.L.], v. 13, n. 2, p.141-146, 21 jul. 2010.

SCOTT, K. G. E., YU, L. C. H.; BURET, A. G. Role of CD8 + and CD4 + T Lymphocytes in Jejunal Mucosal Injury during Murine Giardiasis. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 72, n. 6, p. 3536-3542, jun. 2004.

SILVA, S. O. S., RICHTZENHAIN, L. J., BARROS, I. N., GOMES, A. M. M. C., SILVA, A. V., KOZERSKI, N. D., CERANTO, J. B. A., KEID, L. B., SOARES, R. M. A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 135, n. 3, p. 551-557, nov. 2013.

SMITH A, RACHER M, SMERDON W, ADAK GK, NICHOLS G, CHALMERS RM. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Epidemiol. Infect.** v. 134, n. 6, p. 1141-1149, 2006.

SMITH, H.V., NICHOLS, R. A. B. *Cryptosporidium*: detection in water and food. **Exp. parasitol.** v. 124, n. 1, p. 61-79, 2009.

SOLLER, J. A., SCHOEN, M. E., BARTRAND, T., RAVENSCROFT, J. E., ASHBOLT, N. J. Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal contamination. **Water Research**, [S.L.], v. 44, n. 16, p. 4674-4691, set. 2010.

SOLAIMAN, S., ALLARD, S. M., CALLAHAN, M. T., JIANG, C., HANDY, E., EAST, C., HAYMAKER, J., BUI, A., CRADDOCK, H., MURRAY, R. Longitudinal Assessment of the Dynamics of *Escherichia coli*, Total Coliforms, *Enterococcus* spp., and *Aeromonas* spp. in Alternative Irrigation Water Sources: a conserve study. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 86, n. 20, p. 1-15, out. 2020.

SOON, J. M., WAHAB, I. R. A., HAMDAN, R. H., JAMALUDIN, M. H. Structural equation modelling of food safety knowledge, attitude and practices among consumers in Malaysia. **Plos One**, [S.L.], v. 7, n. 15, p. 1-12, 2020.

SULAIMAN, I M. FAYER, R., BERN, C., GILMAN, R. H., TROUT, J. M., SCHANTZ, P. M.; XIAO, L. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 11, p. 1444, 2003.

SPONSELLER, J. K., GRIFFITHS, J. K., TZIPORI, S. The Evolution of Respiratory Cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 575-586, jul. 2014.

SSEMANDA, J. N., REIJ, M. W., VAN MIDDENDORP, G., BOUW, E., PLAATS, R. V. D., FRANZ, E., MUVUNYI, C. M., BAGABE, M. C., ZWIETERING, M. H., JOOSTEN, H. Foodborne pathogens and their risk exposure factors associated with farm vegetables in Rwanda. **Food Control**, [S.L.], v. 89, p. 86-96, jul. 2018.

APHA/AWWA/WEF. Standard Methods for the Evaluation of Water and Wastewater, 2012).

SWIRSKI, A. L., PEARL, D. L., PEREGRINE, A. S., PINTAR, D K. A comparison of exposure to risk factors for giardiasis in non-travellers, domestic travellers and international travellers in a Canadian community, 2006–2012. **Epidemiol. Infect.**, [s. l], v. 5, n. 1, p. 980-999, 2015.

TAHAR, A. S., BILUNG, L. M., GOH, C. S. K., NILLIAN, E., LIM, Y. A. L., RICHARD, R. L., HASHIM, H. F., APUN, K. Contamination of Intestinal Parasites in Vegetables from Kuching. **International Journal Of Current Research And Review**, [S.L.], p. 31-38, 2021.

TEIMOURI, A., KESHAVARZ, H., MOHTASEBI, S., GOUDARZI, F., MIKAEILI, F., BORJIAN, A., ALLAHMORADI, M., YIMAM, Y., AFSHAR, M. J. A. Intestinal parasites among food handlers in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 95, p. 103703, maio 2021.

THOMPSON, R. C. A., COLWELL, D. D., SHURY, T. K., APPELBEE, A. J., READ, C., NIJURI, Z., OLSON, M. The molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* cyst infections in coyotes from Alberta, Canada, and observations on some cohabiting parasites. **Veterinary Parasitology**, 159, p. 167–170, 2009.

TIYO, R., SOUZA, C. Z., NISHI, L., BRUSTOLIN, C. F., RATTI, B. A., GUILHERME, A. L. F. Water From Different Sources Used for the Irrigation of Vegetables to be Marketed: research on *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., and coliforms in parana, brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v. 57, n. 4, p. 333-336, ago. 2015.

TORGERSON, P. R., DEVLEESSCHAUWER, B., PRAET, N., SPEYBROECK, N., WILLINGHAM, A. L., KASUGA, F., ROKNI, M. B., ZHOU, X. N., FÈVRE, E. M., SRIPA, B. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease

Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: a data synthesis. **Plos Medicine**, [S.L.], v. 12, n. 12, p. 1001920-1001941, 3 dez. 2015.

TROLDBORG, M., DUCKETT, D., ALLAN, R., HASTINGS, E., HOUGH, R. L. A risk-based approach for developing standards for irrigation with reclaimed water. **Water Research**, [S.L.], v. 126, p. 372-384, dez. 2017.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Office of Water. Washington DC. Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA.** EPA-815-R- 05-002, 2012.

VAN MAELE-FABRY, LATIN, A. C., HOET, P., LISON, D. Residential exposure to pesticides and childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis. **Environment International**, [s.l.], v. 37, n. 1, p. 280-291, jan. 2011.

WANG, W., WU, Z., DAI, Z., YANG, Y., WANG, J., WU, G. Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. **Amino Acids**, vol. 45, no. 3, p. 463–477, 2013.

WANG, J; PHAM, T. L., DANG, V. T. Environmental Consciousness and Organic Food Purchase Intention: a moderated mediation model of perceived food quality and price sensitivity. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 850-867, 29 jan. 2020.

WHO. World Health Organization. WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases. Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007–2015; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015; Disponível em: [//www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/). Acesso em: 20 set. 2020.

WHO, World Health Organization. Ranking Basado en Múltiples Criterios para la Gestión de Riesgos de Parásitos Transmitidos por Alimentos, 2018. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/I3649ES/>. Acesso em: 01 jun. 2021.

WHO, World Health Organization. Water, Sanitation and Health Team., 2009. Risk assessment of cryptosporidium in drinking water. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70117>. Acesso em: 03 ago. 2021.

WHO, World Health Organization. **Food safety**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 28 jun. 2021.

WIDERSTRÖM, M., SCHÖNNING, C., LILJA, M., LEBBAD, M., LJUNG, T., ALLESTAM, G., FERM, M., BJÖRKHOLM, B., HANSEN, A., HILTULA, J. Large Outbreak of *Cryptosporidium hominis* Infection Transmitted through the Public Water Supply, Sweden. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 581-589, abr. 2014. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

WILLER, H. & Lernoud, J. (eds) The World of Organic Agriculture: Statistics and Emerging Trends 2017 (FiBL-IFOAM, 2017). Disponível em: <https://www.fibl.org/fileadmin/documents/shop/3503-organic-world-2017.pdf>. Acesso em: 26 set. 2020.

WILLER, H. & Lernoud, J. (eds) The World of Organic Agriculture: Statistics and Emerging Trends 2019 (FiBL-IFOAM, 2019). Disponível em: <https://orgprints.org/37018/1/willerlernoud-2019-world-of-organic-low.pdf>. Acesso em: 26 set. 2020.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp. Parasitol.* v. 124, n. 1, p. 80–89, 2010.

XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U., UPTON, S. J. *Cryptosporidium* Taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 72-97, jan. 2004.

XIAO, L., FENG, Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Food And Waterborne Parasitology**, [S.L.], v. 8-9, p. 14-32, set. 2017.

XIAO, L., MORGAN, U. M., LIMOR, J., ESCALANTE, A., ARROWOOD, M., SHULAW, W., THOMPSON, R. C. A., FAYER, R., LAL, A. A. Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 65, n. 8, p. 3386-3391, ago. 1999.

XIAO, S., ZHANG, Y., ZHAO, X., SUN, L., HU, S. Presence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recreational lake water in Tianjin, China: a preliminary study. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-8, 5 fev. 2018.

YIMAM, Y., WORETA, A., MOHEBALI, M. Intestinal parasites among food handlers of food service establishments in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. **Bmc Public Health**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 2-12, 16 jan. 2020.

YAMASHIRO S, LEAL, D. A. G., CANTUSIO NETO, R., FRANCO, R. M. B. Assessment of pathogenic protozoa in lentic and lotic compartments of a tropical

reservoir impacted by cyanobacteria blooms. **Int J Biosciences**, v. 6, n. 1, p. 304–317, 2015.

YAMASHIRO, S., FOCO, M. L. R., PINEDA, C. O., JOSÉ, J., NOUR, E. A. A., SIQUEIRA-CASTRO, I. C. V., FRANCO, R. M. B. *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. removal efficiency of a combined fixed-film system treating domestic wastewater receiving hospital effluent. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 26, n. 22, p. 22756-22771, 6 jun. 2019.

YASUOR, H., YERMIYAHU, U., BEN-GAL, A. Consequences of irrigation and fertigation of vegetable crops with variable quality water: Israel as a case study. **Agricultural Water Management**, [S.L.], v. 242, p. 106362-106363, dez. 2020.

ZAHEDI, A., MONIS, P., DEERE, D., RYAN, U. Wastewater-based epidemiology—surveillance and early detection of waterborne pathogens with a focus on SARS-CoV-2, *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 120, n. 12, p. 1-51, 6 jan. 2021.

ANEXO I: ARTIGO PUBLICADO ORIUNDO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO.

Food Analytical Methods (2021) 14:989–996
https://doi.org/10.1007/s12161-020-01925-x



Parasites in Fresh Produce: a Brazilian Inter-laboratory Evaluation of a Standardized Methodology for the Detection of *Ascaris* sp. in Leafy Vegetables

Carolina Ortiz Pineda¹ · Diego Averaldo Guiguet Leal² · Roberta de Lima² · Patricia Padilha Ribeiro² · Amanda Rodrigues² · Maria Helena Martini³ · Regina Célia Arantes Stancari⁴ · Flaviane Cristina Lopes Matosinhos⁵ · Júlio César Miné⁶ · Juliane Araújo Greinert-Goulart⁷ · Suelen Cristina Grott⁷ · Lucia Maria Guedes Diefenbach⁸ · Beatriz Araújo¹ · Regina Maura Bueno Franco¹

Received: 11 September 2020 / Accepted: 27 November 2020 / Published online: 6 January 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC part of Springer Nature 2021

Abstract

Vegetables are potential vehicles for the transmission of parasites. Helminth eggs have been detected in produce in various countries around the world, with high prevalence rates. However, there is no standard validated method or ISO to the isolation, concentration, and identification of helminth eggs in salad vegetables, which makes comparison difficult since each study utilized different analytical methods and food matrix. The purpose of the present study was to evaluate the effectiveness of a previously described methodology developed for the recovery of *Ascaris* sp. eggs in two different leaf greens under real conditions of use, through the simultaneous application of the same method by ten different laboratories. This is the first collaborative inter-laboratory trial by several laboratories across Brazil. Lettuce and arugula samples artificially contaminated with *A. suum* eggs were analyzed by various laboratories to determine the recovery efficiency of *Ascaris* sp. eggs. A final mean recovery efficiency of 57.10% for *Ascaris* sp. eggs in lettuce and 50.7% in arugula was identified. The methodology applied in this study can be used to evaluate *Ascaris* sp. eggs in vegetables. It is reasonably easy, fast, and efficient in comparison with other methods. The identification of helminth eggs in fresh vegetables using a reliable methodology is important if the microbiological safety of these foods is to be improved.

Keywords *Ascaris* sp. · Foodborne pathogens · Recovery · Rapid method · Vegetables

Diego Averaldo Guiguet Leal
diego.leal@ufpr.br

¹ Laboratório de Parasitologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

² Laboratório de Parasitologia Ambiental, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brazil

³ Instituto Adolfo Lutz (IAL), Campinas, São Paulo, Brazil

⁴ Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Instituto Adolfo Lutz (IAL), Bauri, São Paulo, Brazil

⁵ Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁶ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, Paraná, Brazil

⁷ Laboratório de Parasitologia, Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau, Santa Catarina, Brazil

⁸ Seção de Microscopia e Triagem, Divisão de Análise de Produtos, Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Introduction

A high consumption of vegetables and fruit is recommended for a healthy diet (US Department of Health and Human Services 2015). Eating more vegetables brings benefits for health such as greater vitamin intake and a reduced risk of chronic diseases (Moore and Thompson 2015). A minimum daily consumption of 400 g of vegetables and fruits is recommended by the World Health Organization (2018).

According to Ramos et al. (2013), the incidence of foodborne outbreaks caused by the ingestion of contaminated fresh vegetables has increased in recent years, with salad the product most associated with these outbreaks.

Fresh produce are potential vehicles for the transmission of a variety of microorganisms such as bacteria, viruses, and parasites (Asadpour et al. 2016) as they are frequently consumed raw, without thermal processing and receive minimal washing before ingestion (Lynch et al. 2009).

The primary sources of contamination of vegetables are human and animal fecal contamination, polluted water (irrigation, cleaning), and contamination during the production, harvesting, transportation, preparation, and/or processing of the vegetables (Mohamed et al. 2016). The use of polluted water, as well as resulting in contamination throughout the network of venues where food is handled, has been strongly correlated with outbreaks of diarrhea and other foodborne diseases (Dueda et al. 2014; Perez-Mercado et al. 2018).

Helminth eggs have been detected in produce in various countries worldwide with high rates of prevalence. Examples include 38.3% of lettuces sampled in Egypt (Said 2012), 36% of vegetables grown in wastewater-irrigated areas of Titagarh, West Bengal, India (Gupta et al. 2009), 58% of fresh salad vegetables in Libya (Abougrain et al. 2010), and 85.19% of fresh vegetables sold in traditional markets in Hue City, Vietnam (Chau et al. 2014), which were highly contaminated with helminth eggs.

It was estimated that 1.45 billion people worldwide were infected with at least one species of intestinal nematode (Pullan et al. 2014) in the first decade of this century, causing symptoms such as abdominal pain, diarrhea, vomiting, anorexia, nausea, fatigue, and weight loss (Brooker 2010). Children under the age of ten were the most affected (Pullan et al. 2014).

In Brazil, at least 195,516 individuals showed positive parasitological results for *Ascaris lumbricoides*, 106,615 for hookworms, and 74,312 for *Trichuris trichiura* between 2008 and 2013. These tests were conducted among school-age children and young people in 1227 municipal regions participating in the Brazilian Schistosomiasis Surveillance Program (Ministry of Health, Brazil).

Several studies have demonstrated the contamination of leafy vegetables by parasites in various regions in Brazil (Soares and Cantos 2006; Arbos et al. 2010). A wide variety of methodologies has been reported in these studies, demonstrating a lack of consensus among Brazilian laboratories when performing these analyses. Moreover, only a few studies have provided information about the effectiveness of methods utilized for the recovery of helminth larvae and eggs in salad vegetables (Matosinhos et al. 2016).

Standard methods are required for the isolation, concentration, and identification of parasitic stages in salad vegetables. Such techniques must be robust enough to detect small numbers of organisms and should be validated before use in analytical laboratories (Rodríguez-Lázaro et al. 2007).

In this context, Matosinhos et al. (2016) standardized the steps for detecting helminths in vegetables using assays involving the artificial contamination of lettuce with the eggs and larvae of helminths and evaluated the recovery obtained by this method. Using different levels of artificial contamination ($n = 50$), the authors obtained a mean recovery rate of

62.6% (± 20.2) for *A. suum* eggs, 51.9% (± 20.0) for hookworm eggs, and 50.0% (± 27.3) for *A. ceylanicum* larvae.

With the aim of meeting requirements for the surveillance of foodborne diseases in Brazil and to encourage the adoption of a standardized protocol for the detection of *Ascaris* spp. in leafy vegetables by laboratories across the country, a collaborative inter-laboratory trial was performed to evaluate the recovery efficiency achieved by each laboratory using the recommended methodology. The training of professionals skilled in the parasitological analysis of fresh produce represents another significant contribution arising from this project.

Material and Methods

Study Design

Lettuce (*Lactuca sativa*) (var. “solta crespa”; Henz and Suinaga 2009) and arugula (*Eruca sativa*) were chosen as matrices for this collaborative inter-laboratory trial. Lettuce is the most consumed and most economically important leafy vegetable in Brazil (CEAGESP 2013) and grows in every region of the country. It is followed in these classifications by arugula. We evaluated the recovery efficiency of the Matosinhos et al. (2016) methodology, focusing on *Ascaris* spp. eggs due to the relevance of this parasite in Brazil.

Eligibility Criteria

The participating laboratories had previous experience in food microscopy and/or parasitology (in the case of laboratories from universities). A total of ten laboratories representing five Brazilian states (São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Santa Catarina and Rio Grande do Sul) were included in the study (Table 1). Each laboratory was assigned an arbitrary, unique

Table 1 Participant laboratories ($n = 10$) in an inter-laboratorial assay of evaluation of a methodology of *Ascaris suum* detection

ID Lab	City	State
1*	Carapinas	São Paulo
2	São Paulo	São Paulo
3	Carapinas	São Paulo
4	Bauri	São Paulo
5	Ponta Grossa	Paraná
6	Carapinas	São Paulo
7	Belo Horizonte	Minas Gerais
8	Porto Alegre	Rio Grande do Sul
9	Blumenau	Santa Catarina
10	Curitiba	Paraná

* Central Laboratory

number which remained constant throughout the collaborative trial.

One laboratory was chosen as the central laboratory (LAB one). This location was responsible for preparing the purified egg suspension to be used in the tests and sending it, following enumeration, to the other laboratories, receiving and analyzing the results, as well as for the experimental planning of this trial. Additionally, to evaluate the recovery efficiency and the quality of the inoculum, the central laboratory applied the methodology with the same inoculum before sending it to the other laboratories. The recovery data from the central laboratory were not considered in the overall analysis.

Design of Collaborative Trial

Before the beginning of the trial, each laboratory received a copy of the protocol with figures detailing the step-by-step methodology to be used. The laboratories were therefore familiar with the method and were encouraged to submit any questions to LAB one and to indicate which steps of the protocol required amendment to improve clarity.

A workshop was also organized by LAB one (Workshop I: Current Scenario of Applied Analytical Methodologies for Food Parasite Detection), attended by the majority of the staff from the member laboratories. In this workshop, a detailed description of the Matosinhos et al. (2016) protocol was provided, along with instruction regarding the equipment utilized in this analytical procedure.

To evaluate the recovery efficiency of the methodology, each laboratory tested the artificial contamination of lettuce ($n = 3$) and arugula ($n = 3$) samples using aliquots from the purified egg suspension of *Ascaris suum* as an inoculum, employed in this study as a model for *Ascaris lumbricoides*. Participating laboratories performed lettuce and arugula seeding experiments without prior knowledge of the number of eggs in the seeding suspension (blinded trials). The vegetables were purchased from supermarkets, street markets, and local retail outlets. All the leaves were pre-washed before the assays and 30 g were used in each sample. Control samples of unseeded lettuce and arugula were also processed to confirm the negativity of these vegetables before the seeding tests.

The participating laboratories used aliquots of purified suspensions containing 350 *Ascaris suum* eggs/ten microliters to contaminate the vegetable samples. To achieve this, the seeding suspensions were added at points as evenly distributed as possible over the entire sample. Samples were then left at room temperature for 2 h before being processed by the chosen methodology.

Briefly, 30 g of each artificially contaminated leafs were placed in new plastic bags and 200 ml of 1 M glycine solution (pH = 5.5) was added to each bag, being manually shaken for 3 min. The liquid was filtered through a sieve into a conical sedimentation cup and kept undisturbed for 2 h. After this, the

supernatant was discarded and approximately 10 ml pellet was transferred to a 15-ml centrifuge tube and the sample centrifuged at $1120 \times g$ for 5 min. The supernatant was discarded, and the entire pellet was utilized to produce slides for the counting and identification of recovered eggs. The eggs were visualized under a light microscope at a magnification of $\times 200$.

Each laboratory was instructed to keep a detailed record of sample processing and to report any deviation from the protocol during the collaborative trial. After receiving all the results from the participant laboratories, the central laboratory (LAB one) organized and analyzed the data. Laboratories were encouraged to analyze the samples and report their results back to LAB one, 3 weeks after receiving the purified suspension.

All the commercial reagents utilized in this collaborative trial were within their respective validity dates. For each laboratory, the mean number of eggs recovered from three analyzed samples of lettuce or arugula was compared with the average number of eggs present in the seeding suspension used to artificially contaminate the vegetables. The percentage of recovery was also calculated for each matrix (lettuce or arugula).

Purified Suspension of *Ascaris suum* Eggs

In order to obtain the purified suspension of helminth eggs, *Ascaris suum* adult gravid females were collected from a pig at a slaughterhouse in the state of Santa Catarina State by LAB nine staff and sent to LAB one, where female worms were dissected in accordance with a protocol based on Jensen et al. (2009). Briefly, the uterus of the female worm was removed under a stereomicroscope to obtain the eggs. Mature eggs were isolated by cutting the last 2 cm of the bifurcation of the uterus. The eggs were placed in a Petri dish and subsequently washed three times by centrifugation in dechlorinated water. They were stored (until enumeration) in dechlorinated water containing a few drops of 5% formalin solution due to the risk of potential spiking during shipment since the egg suspension was sent to each laboratory by mail.

To calculate the number of eggs in the purified suspension, the eggs present in ten aliquots of 10 μ l of the suspension were counted, and the average number was considered when generating a sufficient number of vials to be sent to the participant laboratories by Brazilian Express Mail (Sedex 10[®]). The concentration of eggs in the seed suspensions in the vials was checked before delivery and on two occasions during assays by LAB eight and LAB ten to confirm homogeneity.

Statistical Analysis

Initially, data normality was tested using the Shapiro-Wilk method. Although the lettuce data were found to be normal,

the arugula results were not. The adequacy of the Matosinhos et al. (2016) methodology for the vegetable matrices (lettuce and arugula) was checked by the Wilcoxon test, and the ANOVA test was employed to analyze the recovery efficiencies achieved by the laboratories participating in this study. The Tukey test was used to identify differences in arugula data between the laboratories. A p value < 0.05 was considered statistically significant in all cases. Data were analyzed using the R[®] 3.3.2 software (R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria).

Results

The absence of helminth eggs in leaves of pre-washed vegetables without artificial contamination utilized as samples in this study was confirmed. Moreover, no false-negative results were reported by the participant laboratories, allowing the inference that the methodology proposed by Matosinhos et al. (2016) had a sensitivity of 100% when used in the analytical laboratories.

The percentage of *Ascaris suum* eggs with a mammillated layer in the seeding suspension was 75.3%. For each round of trials (lettuce and arugula), and at the end of the experiments, the concentration of eggs in the seeding suspensions was checked by two participant laboratories (eight and ten). The results (mean = 333 eggs/10 μ l for triplicate aliquots) were similar to those obtained in the standardizing step of this suspension by LAB one.

The data was found to be abnormal using the Shapiro-Wilk test ($W = 0.92666$, p value = 0.04899 for arugula samples and $W = 0.95376$, p value = 0.06952 for lettuce samples). The proposed protocol for the detection of *Ascaris suum* eggs in the vegetables under evaluation achieved a final mean recovery efficiency of 57.10 (\pm SD: 37.6) for the lettuce samples and 50.7% (\pm SD: 29.0) for the arugula samples in this inter-laboratory trial, representing a detection challenge of approximately 11 eggs per gram of vegetable leaves.

When the mean recovery efficiency achieved by all the participating laboratories was considered, it was found that the Matosinhos et al. (2016) technique allowed the recovery of *Ascaris suum* eggs irrespective of the vegetable matrix analyzed, as revealed by the Wilcoxon test (p value = 0.6281). The central lab obtained in-house recovery efficiencies of around 75.4% and 48.8% for lettuce and arugula, respectively.

The majority of participating laboratories reported greater difficulty processing the arugula samples than the lettuce leaves (Table 2). The arugula samples contained a greater amount of dirt, making the reading of the slides via microscopy more difficult and impairing the identification of the eggs.

The recovery of eggs in lettuce did not vary between the laboratories (ANOVA $F = 2.07$, $df = 8$, $p = 0.09$); while there were significant differences for arugula (ANOVA $F = 4.10$,

$df = 8$, $p = 0.006$). The Tukey test (post hoc) indicated that the differences between laboratories 3–2 (0.043), 7–3 (0.032), and 9–7 (0.043) were significant.

Discussion

Foodborne pathogens are a major concern for the food industry (Cocolin and Rantsiou 2016). In both developed and developing countries, enteropathogens transmitted through the fecal-oral route continue to cause numerous cases of intestinal disease due to the consumption of contaminated fresh produce, while in recent years an increasing number of foodborne disease outbreaks have been associated with the consumption of fresh produce (Lynch et al. 2009; Berger et al. 2010; Callejón et al. 2015; Herman et al. 2015).

The number and type of microorganisms found in fresh produce vary considerably depending on the crop type and growing conditions (Ramos et al. 2013). Among the pathogens which can be found in leafy vegetables, parasites are increasingly recognized as a global threat to food safety and commerce, although foodborne parasites are among the most neglected global pathogens that affect humans (Gajadhar 2015).

Modern food production requires an approach in which several critical control points are monitored (Newell et al. 2010). While there is an ISO Standard Method for analyzing fresh produce for protozoa contamination (ISO 18744; 2016), there is a paucity of practical and efficient methods for detecting helminthic eggs that can be applied to vegetables. However, intestinal infectious diseases remain a major public health concern and represent a significant social and economic cost throughout the world (Newell et al. 2010).

In Brazil, data from the Ministry of Health's Mortality Information System reveal that an average of 853 deaths were caused by the main intestinal helminths between 2000 and 2011, with *Ascaris lumbricoides* infection accounting for 827 (97.0%) of these deaths (Martins-Melo et al. 2017).

The real impact of the disease and the burden of this parasitosis are unknown and underestimated in Brazil due to the lack of a nationwide mandatory reporting and active surveillance system. Cases of ascariasis affected an estimated 41.7 million people in Brazil in 2008 (Hotez 2008) and 29.7 million in 2016 (Martins-Melo et al. 2017). Enteroparasitosis remains highly prevalent, particularly where the sanitation facilities or socioeconomic conditions of the population are more precarious.

The aim of the present study was to evaluate the effectiveness of a previously developed method for the detection of helminth eggs and larvae in leafy vegetables (Matosinhos et al. 2016), focusing on the recovery of *Ascaris* sp. eggs under real conditions of use. The evaluation was performed

Table 2 Number of eggs recovered and recovery efficiencies (%) achieved by the participant laboratories ($n = 9$) after processing lettuce and arugula samples in an inter-laboratorial assay of evaluation of a methodology of *Ascaris suum* detection

Lab.	Vegetable	No. of eggs recovered (mean \pm SD)	Recovery efficiency (%)
2	Lettuce	360.0 \pm 176.6	102.8 \pm 50.3
	Arugula	275.5 \pm 38.9	78.7 \pm 11.1
3	Lettuce	290.6 \pm 39.1	83.0 \pm 11.2
	Arugula	54 \pm 37.8	15.4 \pm 10.8
4	Lettuce	201.7 \pm 21.2	57.6 \pm 6.0
	Arugula	171.3 \pm 43.1	48.9 \pm 12.3
5	Lettuce	81.0 \pm 53.5	23.1 \pm 15.3
	Arugula	259.0 \pm 31.0	74.0 \pm 8.9
6	Lettuce	214 \pm 142.6	61.2 \pm 40.7
	Arugula	173.6 \pm 106.8	49.6 \pm 30.5
7	Lettuce	255.3 \pm 111.8	72.9 \pm 31.9
	Arugula	274.0 \pm 56.9	78.4 \pm 16.2
8	Lettuce	147.3 \pm 19.7	42.0 \pm 5.6
	Arugula	117.0 \pm 8.5	33.4 \pm 2.4
9	Lettuce	65.6 \pm 6.3	18.7 \pm 18
	Arugula	62.6 \pm 15.0	17.9 \pm 3.72
10	Lettuce	183.3 \pm 118.05	52.3 \pm 33.7
	Arugula	228.3 \pm 172.18	62.7 \pm 47.3
1 ^a	Lettuce	264.0 \pm 81.1	75.4 \pm 23.1
	Arugula	171.0 \pm 108.5	48.8 \pm 31.0

The method is based on the previous publication by Matosinhos et al. (2016)

^a Central Laboratory (recovery data from this laboratory were not considered in the overall analysis)

through the simultaneous implementation of the same methodology by nine different laboratories.

To the best of our knowledge, there are no studies that evaluate the methodologies of detection of helminth eggs in vegetables involving the participation of laboratories from several Brazilian states. The experimental design employed in this study therefore represents a significant contribution to existing knowledge, as the same methodology was implemented and used by different laboratories, allowing the comparison of the effectiveness of the method as well as analysis of difficulties that arose during its application.

In this collaborative inter-laboratory assay, *Ascaris suum* eggs were used as a model for *Ascaris lumbricoides* infection due to the ease of obtaining females of this worm species. Nowadays, however, these parasites should be considered a single species (Leles et al. 2012; Alves et al. 2016). Moreover, the use of a standardized methodology is essential for the meaningful interpretation of surveillance data, the investigation of outbreaks, and reflections on the distribution of parasite contamination.

In Brazil, the immediate notification of outbreaks of foodborne diseases is compulsory under Decree 204/2016 (Ministry of Health 2016). According to SINAM/SVS data, 6848 foodborne outbreaks occurred in the country between 2007 and 2016. Vegetables represented 0.8% of these events, although in 66.9% of episodes the type of food was not

elucidated. In this context, the recovery of parasite stages from food produce such as leafy fresh vegetables requires considerably more research.

The high level of environmental contamination through the eggs of helminth parasites observed in many regions of the world, including Europe, is associated with the high fertility of these soil-transmitted helminths and their persistence over months and years (Klapeč and Borecka 2012). The identification of parasitic stages in fresh vegetables using a reliable methodology is important if the microbiological safety of these foods is to be improved. There is no method recommended by legislation for analyzing these parasites in food samples in Brazil (Ministry of Health, Brazil, SVS; 2019). It is therefore relevant to assess and standardize detection methodologies that identify the real sensitivity of methods for the isolation and detection of parasites in vegetable samples destined for human consumption.

The possibility of sample contamination by spiking during the assays is remote as none of the participant laboratories detected parasites in the negative control samples. The vegetables were also washed before the experiments.

Although face-to-face method-specific training was not provided in the present study, the mean recovery efficiencies achieved for lettuce (57.10 \pm 37.69%) and arugula (50.74 \pm 29.06%) by each participant laboratory were close to the average recovery reported by Matosinhos et al. (2016) in their

inter-laboratory analyses with only three laboratories. Egg recovery efficiencies did not differ greatly for either of the vegetable matrices utilized in the study. Overall, these data suggest that the methodology standardized is sufficiently straightforward and robust and can be readily implemented in laboratories with some experience in food microscopy.

Regarding the final mean recovery scores for lettuce as a reference value (mean = 57.10%), one laboratory described a recovery of over 100% and reported difficulties with the homogenization of the inoculum prior to the contamination of the samples; four laboratories obtained higher recovery efficiencies than the final mean; three laboratories achieved recovery efficiencies very close to the reference value. Of the two laboratories that obtained the lowest values, one reported difficulties in washing the leaves with the glycine solution as they folded during the washing step.

For the arugula samples, four laboratories reached higher recovery efficiencies than the final mean (mean = 50.74%); another four achieved values very close to the reference, and two laboratories attained low recoveries. In general, the laboratories experienced greater difficulty processing the arugula than the lettuce samples, as pre-washed vegetables were used for experiments and minimally processed produce is more perishable than original raw materials (Sanz et al. 2002). Moreover, the arugula leaves have trichomes on their surfaces, and these structures can provide an ecological niche for different microorganisms (Ramos et al. 2013), unlike lettuce, the leaves of which have a smooth texture.

The in-house recovery efficiencies achieved by the leading laboratory for both vegetables prove that the experimental conditions in this study were adequate.

Notwithstanding this fact, the magnitude of standard deviation for both vegetable matrices reflects the variability of recovery efficiencies achieved by the various participating laboratories due to the use of different glycine brands and types of equipment, and the individual experience of each microscopist in correctly recognizing the eggs of *Ascaris* sp.

It is recommended that acceptance criteria are adopted when evaluating the performance of methodologies for the detection of resistance forms of parasites in fresh vegetables. In the absence of Brazilian guidelines, the criterion adopted by Utaaker et al. (2015) for detecting cysts/oocysts of pathogenic protozoa in lettuce is proposed, with an adequate recovery of 30%. In a recent review of methods for detecting soil-transmitted helminth (STH) eggs in environmental media, a study by Collender et al. (2015) demonstrated a median method recovery efficiency of 25%.

Laboratories three, five, and nine had lower recovery values than those proposed in this study (< 30%). The recovery of the eggs could be affected by the texture of the vegetables studied and the debris that they contained. It is important to identify the vegetal texture and debris when analyzing lettuce or arugula samples for the presence of *Ascaris* eggs. If

vigorous agitation is employed during the washing of the samples with the glycine solution, the leaves will release a significant amount of vegetal tissue, causing a significant amount of debris to appear and affecting the microscopic examination. The influence of vegetal type on recovery efficiency should be measured in future studies using samples from other kinds of vegetables (cabbage, cilantro, and basil, among others).

The variability of equipment, reagents, and analysts in our experiments may also have affected the recovery efficiency of these laboratories. Laboratory nine reported problems with the calibration of the centrifuge, and the other laboratories reported the presence of egg conglomerates when performing microscopic examination, making the procedure difficult.

Commercial opportunities involving this type of food in the global vegetable industry are increasing. It is necessary, however, to consider hygiene and sanitary quality laws that regulate the entry of these vegetables into different countries, in order to establish containment measures to prevent food contaminated with pathogens from being sold. An analysis of the standards established for criteria in terms of the taking of samples, the conducting of analysis and the application of corrective actions, in harmony with food law and the directives of the competent authorities should also be considered. The establishing of standardized methodologies for the detection of parasites in vegetables is of great importance.

Conclusions

The methodology used in this research, which is reasonably quick and efficient in comparison with other methods, can be used to evaluate *Ascaris* eggs in vegetables. Vegetable contamination measurements can also be used as an operational tool for evaluating interventions aimed at reducing *Ascaris* sp. transmission.

Acknowledgments We are deeply grateful to Márcia Dinov Nogueira, Gina Maria B. Q. Cardoso, Eliane M. Sasso, Marlene Tibuko Ueta, Silmara M. Allegretti, Juliana do Rocio C. Ribeiro, Guilherme Lopes Gonçalves, Caroline de Almeida Rossi, Lidia Berenice Chasin, Rosângela Oliveira Delmindo, and Thelma Constantino de Assis who gave their support in their inter-lab analyses of lettuce and arugula.

Author Contributions Carolina Otiz Pineda: conceptualization, methodology, investigation, data curation, and writing (original draft preparation).

Diego Averaldo Gagnier Leal: conceptualization, methodology, investigation, data curation, writing (original draft preparation), and supervision.

Roberta de Lima: investigation, data curation, and writing (original draft preparation).

Amanda Rodrigues: investigation and data curation.

Patricia Padilha Ribeiro: investigation and data curation.

Maria Helena Martins: investigation and data curation.

Regina Célia Arantes Stancari: investigation and data curation.

- Mohamed MA, Siddig EE, Elaagip AH, Edris AM, Naur AA (2016) Parasitic contamination of fresh vegetables sold at central markets in Khartoum State, Sudan. *Annals Clin Microbiol Antimicrob* 15:17. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0133-5>
- Moore LV, Thompson FE (2015) Adults meeting fruit and vegetable intake recommendations – United States, 2013. *Morbid Mortal Weekly Rep* 64(26):709–713
- Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aikawa-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelier M, Threlfall J, Scheetz F, der Giessen J, Knuse H (2010) Food-borne diseases – the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol* 139:S3–S15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021>
- Perez-Mercado LF, Lalander C, Josef A, Ottosen J, Iriarte M, Oporto C, Vinnerås B (2018) Pathogens in crop production systems irrigated with low-quality water in Bolivia. *J Water Health* 16(6):980–990. <https://doi.org/10.2166/wh.2018.079>
- Pullan RL, Smith JL, Iannasaria R, Brooker SJ (2014) Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasit Vectors* 7:37. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-37>
- Ramos B, Miller FA, Brandão TRS, Teixeira P, Silva CLM (2013) Fresh fruits and vegetables – An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Sci Emerg Technol* 20:1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.002>
- Rodríguez-Lázaro D, Lombard B, Smith H, Rzeutka A, D'Agostino M, Helmuth R et al (2007) Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. *Trends Food Sci Technol* 18(6):306–319. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.009>
- Said DES (2012) Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. *Alexandria J Med* 48(4):345–352. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2012.05.005>
- Sanz S, Giménez M, Orlate C, Lamas C, Poutu J (2002) Effectiveness of chlorine washing disinfection and effects on the appearance of ari-choke and horage. *J Appl Microbiol* 93(6):986–993. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01773.x>
- Soures B, Santos GA (2006) Detecção de estruturas parasitárias em hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, SC, Brasil. *Rev Bras Ciências Farmac* 42(3):455–460. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000300015>
- US Department of Health and Human Services. Dietary Guidelines for Americans 2015–2020. 8th edition. (2015). <https://health.gov/our-work/food-nutrition/2015-2020-dietary-guidelines>. Accessed 5 July 2020
- Utaker KS, Huang Q, Robertson LJ (2015) A reduced-cost approach for analyzing fresh produce for contamination with *Cryptosporidium* oocysts and/or *Giardia* cysts. *Food Res Int* 77(3):326–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.010>
- World Health Organization - WHO (2018). Healthy diet. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>. Accessed 10 July 2020

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.