



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANA KARBIAK

PADRONIZAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA ANÁLISE PARASITOLÓGICA
DE FORMULAÇÕES ENTERAIS MANIPULADAS EM DOMICÍLIOS E AFERIÇÃO
DA SANIDADE DO ALIMENTO DESTINADO A PACIENTES COM NECESSIDADES
ESPECIAIS DE CUIDADOS DE SAÚDE

CURITIBA

2024

LUCIANA KARBIAK

PADRONIZAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA ANÁLISE PARASITOLÓGICA
DE FORMULAÇÕES ENTERAIS MANIPULADAS EM DOMICÍLIOS E AFERIÇÃO
DA SANIDADE DO ALIMENTO DESTINADO A PACIENTES COM NECESSIDADES
ESPECIAIS DE CUIDADOS DE SAÚDE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentação e Nutrição, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como subsídio para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal

Coorientadora: Prof. Dra. Márcia Regina Beux

Coorientadora: Prof. Dra. Lize Stangarlin-Fiori

CURITIBA

2024

Karbiak, Luciana

Padronização de uma metodologia para análise parasitológica de formulações enterais manipuladas em domicílios e aferição da sanidade do alimento destinado a pacientes com necessidades especiais de cuidados de saúde [recurso eletrônico] / Luciana Karbiak – Curitiba, 2024.

1 recurso online : PDF

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2024.

Orientador: Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal

Coorientadores: Profa. Dra. Márcia Regina Beux

Profa. Dra. Lize Stangarlin-Fiori

1. Nutrição enteral. 2. Helmintos. 3. Eucariotos. 4. Bactérias. 5. Segurança alimentar. I. Leal, Diego Averaldo Guiguet. II. Beux, Márcia Regina. III. Stangarlin-Fiori. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 615.85482



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ALIMENTAÇÃO E
NUTRIÇÃO - 40001016074P7

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LUCIANA KARBIAK** intitulada: **Padronização de uma metodologia para análise parasitológica de formulações enterais manipuladas em domicílios e aferição da sanidade do alimento destinado a pacientes com necessidades especiais de cuidados de saúde**, 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, 05 de Julho de 2024.

Assinatura Eletrônica

10/07/2024 09:53:07.0

DIEGO AVERALDO GUIGUET LEAL
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

10/07/2024 15:15:37.0

JULIANE ARAÚJO GREINERT GOULART
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

10/07/2024 10:42:48.0

PATRICIA DO RÓCIO DALZOTO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4010 - E-mail: pgnutricao@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: 379779

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/validante/autenticacaoassinatura.jsp> e insira o código 379779

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças e me permitir chegar até aqui, vivenciando este momento que sempre sonhei.

A minha família, principalmente minha mãe, Lucia, meus irmãos Silvano e Adriano, meus sogros Neiva e Juares, e meu namorado Vinicius, por sempre estarem torcendo por mim, acreditando e me incentivando desde o começo.

Ao meu pai, Thomaz, você não pôde estar presente aqui comigo durante este período, mas sei que de onde estiver, sempre me guiará. Esta conquista também é por você.

Ao meu queridíssimo Orientador Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal por acreditar em mim e me aceitar em sua excelente equipe de pesquisadores. Obrigada por toda a sua parceria, dedicação e orientação para esta pesquisa e meu desenvolvimento acadêmico. Também agradeço as minhas Coorientadoras Prof. Dra. Márcia Regina Beux e Prof. Dra. Lize Stangarlin-Fiori por me apresentarem este grande projeto que pude fazer parte, por suas orientações, ensinamentos e incentivos.

Aos meus colegas de laboratório de parasitologia ambiental, José, Jonathan, Israel, Lucimara, Mariana e Gabriel, e de microbiologia de alimentos, Marcelly e Yngrid, obrigada por todo apoio e ajuda nas atividades de laboratório.

Aos técnicos Jaque, Jair, Luiz e Eliana por toda a ajuda nas atividades de laboratório.

Ao Instituto Adolfo Lutz pela parceria nas análises desta pesquisa.

A Universidade Federal do Paraná, pela estrutura concedida, pelos excelentes colaboradores, incluindo a equipe de docentes, por me proporcionarem uma formação sólida para exercício da profissão.

RESUMO

A Nutrição Enteral Domiciliar é uma modalidade de atendimento nutricional, que visa garantir o Direito Humano à Alimentação Adequada. No domicílio, as preparações enterais com alimentos, mistas e comerciais podem ser utilizadas pelos pacientes. Porém, a necessidade de manipulação, utilização de utensílios domésticos e ingredientes variados, pode favorecer a contaminação microbiológica e parasitológica. A contaminação por bactérias em diferentes formulações enterais já foi amplamente documentada, contudo, nenhum estudo foi realizado acerca da contaminação por parasitos. Além disso, não há um método estabelecido para análise de parasitos em formulações enterais manipuladas. Os principais objetivos deste estudo foram: 1 - padronizar uma metodologia de detecção de ovos de helmintos em formulações enterais preparadas com frutos e hortaliças frescas; 2 - implementar a técnica previamente padronizada para avaliação da contaminação por parasitos nas amostras de formulações enterais contendo alimentos crus; 3 - detectar e quantificar a concentração de aeróbios mesófilos, *Escherichia coli* e *Staphylococcus coagulase-positiva* nas formulações enterais administradas em domicílio. O estudo ocorreu em duas etapas: 1 - padronização de metodologia para análise parasitológica, através de experimentos de contaminação artificial em preparações enterais com alimentos; 2 - análise microbiológica e parasitológica para pesquisa de helmintos e protozoários nas formulações utilizadas em domicílios de Curitiba, Pinhais e Piraquara, no Paraná. Para tanto, foram produzidas duas preparações com alimentos: 1 - couve, laranja, alface, agrião e água filtrada; 2 - morango e água filtrada. Duas doses contendo um número conhecido de ovos de *Ascaris suum* (1 = 207 ovos e 2 = 76 ovos) foram inoculadas em ambas as preparações. Para estimar a sensibilidade da taxa de recuperação de ovos, foram analisados 4 protocolos por preparação/dose em triplicata (48 ensaios), e as seguintes variáveis foram analisadas: homogeneização (manual ou agitador magnético) e solução de dispersão (Glicina 1M pH 5,5 ou Alconox[®] 0,1 %). Os protocolos tiveram como etapa comum a sedimentação por 2 horas, centrifugação e leitura de todo o sedimento. O isolamento de bactérias foi feito por técnicas microbiológicas convencionais. A maior taxa de eficiência de recuperação para a preparação 1 foi obtida com o protocolo 2 - Glicina e homogeneização por agitador magnético - média de 66,02% e 55,26% para as doses 1 e 2, respectivamente. Para a preparação 2, o protocolo 4 apresentou melhor desempenho (Alconox[®] e agitador magnético) – dose 1 (65,17%) e 2 (52,19%). Ovos de *Toxocara* sp. e da família ancylostomatidae foram detectados em situação natural de contaminação nas preparações 1 e 2, respectivamente. Nas amostras que continham ingredientes crus, coletadas de domicílios de pacientes, oocisto de *Cryptosporidium* spp., foi detectado. Do total de 68 formulações enterais analisadas, em 64 (94,11%), observou-se a presença das bactérias pesquisadas estando em desacordo com a legislação vigente, por excederem em pelo menos um dos microrganismos analisados. Aeróbios mesófilos foi o grupo mais comumente detectado sendo a preparação enteral mista a mais contaminada (97,5%). Este constitui o primeiro estudo a padronizar e aferir a sensibilidade de detecção de uma metodologia para a análise de parasitos em formulações enterais. Visto que se trata de pacientes com o sistema imunológico comprometido e necessitam de maior cuidado, os resultados demonstram a importância de um rígido controle acerca da qualidade microbiológica e parasitológica de formulações enterais manipuladas em domicílio, com a premissa de não agravar seu quadro outrora debilitado.

Palavras-chave: nutrição enteral; helmintos; protozoários; bactérias; segurança de alimentos.

ABSTRACT

Home enteral nutrition is a type of nutritional care that aims to guarantee the Human Right to Adequate Food. At home, enteral preparations with food, mixed and commercial can be used by patients. However, the need for manipulation, the use of household utensils and varied ingredients can favor microbiological and parasitological contamination. Bacterial contamination in different enteral formulations has been widely documented, but no studies have been carried out on parasite contamination. Furthermore, there is no established method for analyzing parasites in manipulated enteral formulations. The main objectives of this study were: 1 - to standardize a methodology for detecting helminth eggs in enteral formulations prepared with fresh fruit and vegetables; 2 - to implement the previously standardized technique for assessing parasite contamination in samples of enteral formulations containing raw food; 3 - to detect and quantify the concentration of mesophilic aerobes, *Escherichia coli* and coagulase-positive *Staphylococcus* in enteral formulations administered at home. The study was carried out in two stages: 1 - standardization of the methodology for parasitological analysis, through artificial contamination experiments on enteral food preparations; 2 - microbiological and parasitological analysis to check for helminths and protozoa in the formulations used in households in Curitiba, Pinhais and Piraquara, Paraná. For this purpose, two food preparations were produced: 1 - cabbage, orange, lettuce, watercress and filtered water; 2 - strawberry and filtered water. Two doses containing a known number of *Ascaris suum* eggs (1 = 207 eggs and 2 = 76 eggs) were inoculated into both preparations. To estimate the sensitivity of the egg recovery rate, 4 protocols per preparation/dose were analyzed in triplicate (48 trials), and the following variables were analyzed: homogenization (manual or magnetic stirrer) and dispersion solution (Glycine 1M pH 5.5 or Alconox® 0.1 %). The protocols had the common step of sedimentation for 2 hours, centrifugation and reading of the entire sediment. Bacteria were isolated using conventional microbiological techniques. The highest recovery efficiency rate for preparation 1 was obtained with protocol 2 - Glycine and homogenization by magnetic stirrer - an average of 66,02% and 55,26% for doses 1 and 2, respectively. For preparation 2, protocol 4 achieved better performance (Alconox® and magnetic stirrer) - dose 1 (65.17%) and 2 (52,19%). The natural occurrence of *Toxocara* sp. and ancylostomatidae eggs were detected in preparations 1 and 2, respectively. In samples containing raw ingredients collected from patients' homes, *Cryptosporidium* spp. oocysts were detected. Of the total of 68 enteral formulations analyzed, 64 (94,11%) showed the presence of the bacteria investigated, and were in disagreement with current legislation, as they exceeded at least one of the microorganisms analyzed. Mesophilic aerobes were the most commonly detected group, with mixed enteral preparations being the most contaminated (97,5%). This is the first study to standardize and measure the detection sensitivity of a methodology for the analysis of parasites in enteral formulations. Given that these are patients with compromised immune systems who require greater care, the results demonstrate the importance of strict control over the microbiological and parasitological quality of enteral formulations handled at home, with the premise of not aggravating their once debilitated condition.

Keywords: enteral nutrition; helminths; protozoa; bacteria; food safety.

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Variáveis empregadas para padronização do protocolo de detecção de ovos de helmintos em PEA, em amostras contendo hortaliças ou frutos frescos, contaminadas artificialmente com duas doses de ovos.....	46
Fluxograma 2: Protocolo empregado para identificação e enumeração dos microrganismos <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e aeróbios mesófilos.....	50
Fluxograma 3: Protocolo empregado para verificação da contaminação por oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Regiões destacadas onde foram realizadas as coletas das amostras – Curitiba, Pinhais e Piraquara-PR.....	49
Figura 2A: ovo de <i>Ascaris suum</i> (marcado com a seta em vermelho), visualizado em 40x na PEA 1, utilizando Glicina (1M, pH 5,5).....	63
Figura 2B: ovo de <i>Ascaris suum</i> (marcado com a seta em vermelho), visualizado em 40x na PEA 1, utilizando Alconox®.....	63
Figura 3A: processo de sedimentação da PEA 2, utilizando o protocolo 4.....	64
Figura 3B: ovos de <i>Ascaris suum</i> (marcado com a seta em vermelho), visualizados em 40x na PEA 2, utilizando Alconox®.....	64
Figura 4A: Ovo viável de <i>Toxocara</i> sp., corado com <i>Trypan Blue</i> , visualizado em 40x.....	65
Figura 4B: Ácaro visualizado em 40x.....	65
Figura 5A: Ovo de ancilostomatídeo contendo blastômeros visualizado em 40x.....	65
Figura 5B: Artrópode visualizado em 40x.....	65
Figura 6: Artrópode visualizado em 40x em amostra de formulação enteral contendo morango.....	66
Figura 7: Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp., com sutura detectado por RID em amostra de preparação enteral contendo morango.....	67
Figura 8: análise de comportamento da contagem dos microrganismos analisados na Fórmula Comercial.....	74
Figura 9: análise de comportamento da contagem dos microrganismos analisados na Preparação Mista.....	74
Figura 10: análise de comportamento da contagem dos microrganismos analisados na Preparação com Alimentos.....	75
Figura 11: análise de comportamento da contagem dos microrganismos analisados entre todas as formulações enterais.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos que avaliaram a contaminação microbiológica de formulações enterais manipuladas em domicílio.....	22
Tabela 2: Estudos que avaliaram a contaminação por parasitos em produtos frescos no Brasil e no mundo.....	27
Tabela 3: Descrição dos iniciadores moleculares utilizados neste estudo.....	57
Tabela 4: Programa de amplificação da semi-nested PCR em tubo único para <i>Cryptosporidium</i> spp.....	58
Tabela 5: Programa de amplificação da semi-nested PCR em tubo único para <i>Giardia</i> spp., com as respectivas temperaturas do 1º e 2º ciclos.....	58
Tabela 6: Avaliação da sensibilidade de detecção de ovos de helmintos em preparação enteral com alimentos contaminada artificialmente com ovos de helmintos mediante aplicação de diferentes protocolos de homogeneização e soluções de dispersão utilizando a preparação 1 (PEA 1).....	61
Tabela 7: Avaliação da sensibilidade de detecção de ovos de helmintos em preparação enteral com alimentos contaminada artificialmente com ovos de helmintos mediante aplicação de diferentes protocolos de homogeneização e soluções de dispersão utilizando a preparação 2 (PEA 2).....	62
Tabela 8: Critérios utilizados para avaliação da qualidade parasitológica em formulações enterais preparadas com alimentos crus de acordo com as preconizações de legislação no Brasil.....	66
Tabela 9: Composição das formulações enterais analisadas quanto a contaminação por microrganismos e/ou parasitos.....	68
Tabela 10: Frequência de microrganismos com valores acima dos limites recomendados.....	73

LISTA DE SIGLAS

AD - Atenção Domiciliar

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPA - *Ágar Baird-Parker*

CAAE - Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

DALYs - Anos de Vida Ajustados por Incapacidade

DAPI - 4,6-diamidino-2-phenylindole

DHAA - Direito Humano à Alimentação Adequada

DIC - Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DTHA - Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar

ECC - *Escherichia coli*

EDTA - *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA - *Food and Drug Administration*

HIV/AIDS - Vírus Da Imunodeficiência Humana/Síndrome da Imunodeficiência Humana

HTS - Helminhos Transmitidos Pelo Solo

IBCF - Indicadores Bacteriológicos de Contaminação Fecal

IMS - Separação Imunomagnética

ISO - *International Organization for Standardization*

MPC - Sensor Magnético de Segurança

NE - Nutrição Enteral

NED - Nutrição Enteral Domiciliar

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-americana de Saúde

PAN - Programa de Atenção Nutricional a Pessoas com Necessidades Alimentares Especiais

PCA - *Plate Count Agar*

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PCR-RFLP - Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição

PEA - Preparação Enteral com Alimentos

PMC - Programa Melhor em Casa

PNAN - Política Nacional de Alimentação e Nutrição

PR - Paraná

qPCR = Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo

RAS - Rede de Atenção à Saúde

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RID - Reação de Imunofluorescência Direta

RPM – Rotações por Minuto

SAN - Segurança Alimentar e Nutricional

SII - Síndrome Do Intestino Irritável

SISAN - Sistema de Segurança Alimentar e Nutricional

SUS - Sistema Único de Saúde

TCLE - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

TND - Terapia Nutricional Domiciliar

TNE - Terapia Nutricional Enteral

TRIS HCL - Hidroximetil Aminometano

TSI - *Triple Sugar Iron Agar*

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFPR - Universidade Federal do Paraná

USA - Estados Unidos da América

LISTA DE SÍMBOLOS

M - Molar

pH - potencial Hidrogeniônico

® - Marca registrada

Na₄P₂O₇ - Pirofosfato Tetrassódico

C₁₂H₂₅C₆H₄SO₃Na - Dodecilbenzenossulfonato de Sódio

L - Litro

mL - Mililitro

mM - Milímetro

μl - Microlitro

μm - Micrometro

°C - Graus Celsius

™ - Trademark Symbol

rpm - Repetições por minuto

KCl - Cloreto de Potássio

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

nm - nanômetro

> - maior

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. Nutrição Enteral Domiciliar (NED) como Direito Humano à Alimentação Adequada (DHAA): continuidade do cuidado integral à Rede de Atenção à Saúde (RAS).....	18
2.2 Contaminação microbiológica de formulações enterais e Legislações vigentes que auxiliam na determinação de requisitos para análise da NE no Brasil.....	19
2.2.1 Ocorrência de bactérias em formulações enterais manipuladas em domicílio.....	21
2.3 Ocorrência de parasitos como contaminantes de alimentos frescos no mundo e métodos de detecção.....	25
2.4 <i>Ascaris</i> spp. e ascaridiose.....	33
2.5 <i>Cryptosporidium</i> spp., e criptosporidiose.....	35
2.6 <i>Giardia</i> spp., e giardiose.....	37
2.7 <i>Toxoplasma gondii</i> e Toxoplasmose.....	40
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. Objetivo geral.....	42
3.2. Objetivos específicos.....	43
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Tipo de estudo e aspectos éticos.....	43
4.2 Etapa 1: padronização de metodologia para análise parasitológica de amostras de preparações enterais com alimentos (PEA).....	43
4.2.1 Preparo da formulação enteral.....	44
4.2.2 Obtenção e preparo dos inóculos contendo ovos de <i>Ascaris suum</i>	44
4.2.3 Protocolos empregados para determinar a eficiência de recuperação de ovos de helmintos em amostras de PEA.....	45
4.2.3.1 Processamento das amostras contaminadas artificialmente.....	46
4.2.4 Ensaio de aferição para análise da viabilidade dos ovos detectados em situação natural de contaminação.....	47
4.3 Etapa 2: avaliação da qualidade microbiológica e parasitológica de formulações enterais oriundas de domicílios de pacientes.....	48

4.3.1 Amostragem do estudo.....	48
4.3.2 Coleta das amostras.....	48
4.3.3 Análise microbiológica.....	50
4.3.3.1 Identificação e contagem de microrganismos indicadores.....	50
4.3.3.2 Testes confirmatórios.....	51
4.3.4 Análise parasitológica.....	51
4.3.4.1 Pesquisa de ovos e helmintos.....	51
4.3.4.2 Pesquisa de protozoários patogênicos.....	52
4.3.4.2.1 Diluição e centrifugação.....	53
4.3.4.2.2 Separação Imunomagnética (IMS).....	54
4.3.4.2.3. Visualização dos protozoários por RID.....	55
4.3.4.2.4. Detecção de protozoários patogênicos por técnicas moleculares.....	56
4.4. Análise estatística.....	59
5. RESULTADOS.....	59
5.1 Padronização de metodologia para detecção de ovos de helmintos em preparações enterais com alimentos (PEA).....	59
5.2 Contaminação natural por parasitos durante os ensaios de PEA e em amostras de formulações com alimentos crus oriundas da casa de pacientes em uso de NE.....	64
5.3 Qualidade microbiológica de formulações enterais manipuladas em domicílio.....	67
5.3.1 Análise microbiológica.....	71
6. DISCUSSÃO.....	76
7. CONCLUSÕES.....	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
APÊNDICES.....	115
Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos participantes da pesquisa Qualidade na Nutrição Enteral Domiciliar	115

1. INTRODUÇÃO

A Terapia Nutricional Enteral (TNE) é definida por procedimentos terapêuticos que visam a recuperação ou manutenção do estado nutricional de pacientes que não são capazes de satisfazer suas necessidades energéticas e nutricionais diárias por meio da alimentação via oral, mas que possuem o trato gastrointestinal, ou parte dele, funcionando (Brasil, 2016a; O'Connor *et al.*, 2023). Normalmente, pacientes desnutridos ou em risco nutricional apresentam necessidade da TNE, devido a doenças relacionadas ao trato gastrointestinal, causadas pela má absorção e digestão, doenças do sistema neurológico, câncer e queimaduras graves (Boullata *et al.*, 2016; Brown *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2021).

Tendo em vista que, pacientes com necessidades alimentares especiais e dificuldade ou impossibilidade física de locomoção, necessitam de maior frequência de cuidado e acompanhamento, diversos países incentivam o uso da Nutrição Enteral Domiciliar (NED) (De Luis, *et al.*, 2013; Brasil, 2016a; Xavier *et al.*, 2022). A NED é uma modalidade de atendimento nutricional relacionado à assistência domiciliar, que visa garantir o Direito Humano à Alimentação Adequada (DHAA) e melhorar a qualidade de vida do paciente, uma vez que, reduz complicações clínicas e nutricionais, além de contribuir para redução de custos aos serviços de saúde (Schieferdecker *et al.*, 2014; SBNPE, 2018).

Devido à crescente demanda de pacientes em atendimento domiciliar no Brasil, no ano de 2006, a Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba, Paraná, foi uma das pioneiras em implantar o Programa de Atenção Nutricional a Pessoas com Necessidades Alimentares Especiais (PAN), o qual prevê ações de planejamento de Nutrição Enteral Domiciliar (NED) (Galindo *et al.*, 2020). Logo, em 2011, o Ministério da Saúde criou o Programa Melhor em Casa (PMC), prevendo a continuidade do cuidado integrado a Rede de Atenção à Saúde (RAS) através da Atenção Domiciliar (AD), que por meio de equipe multiprofissional, proporciona o cuidado ligado à estrutura familiar e do domicílio, contemplando a NED (Brasil, 2016b).

A prescrição da NED deve ser adequada às necessidades nutricionais e ao quadro clínico do paciente, onde diferentes formulações enterais podem ser manipuladas e utilizadas no âmbito domiciliar, incluindo opções produzidas somente com alimentos, comerciais - à base de nutrientes isolados prontas para uso ou em pó, necessitando serem reconstituídas em água - e mistas, a qual intercala alimentos com a fórmula comercial (Brasil, 2015).

Apesar das fórmulas enterais comerciais serem consideradas mais seguras, do ponto de vista nutricional e higiênico, pela menor necessidade de manipulação, a indicação e preferência por preparações incluindo alimentos em domicílio é relevante, pois permite a individualização da composição nutricional, volume a ser administrado e baixo custo (Baxter *et al.*, 2005; Sousa, Ferreira e Schieferdecker, 2014). Além disso, cuidadores e pacientes relatam maior tolerância a preparações enterais mistas, como redução de engasgos e vômitos além de contribuir para a melhoria do trânsito intestinal e ganho de peso (Bennett *et al.*, 2020; McCormack *et al.*, 2023).

Devido a necessidade de manipulação e utilização de utensílios domésticos, o fornecimento de formulações enterais manipuladas, principalmente preparações que envolvem alimentos, pode favorecer o crescimento e proliferação de microrganismos, podendo aumentar os riscos de infecções e Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA), colocando em risco a segurança do paciente (Brasil, 2010; Bischoff *et al.*, 2022). De fato, a contaminação por bactérias em diferentes formulações enterais utilizadas em domicílio já foi amplamente analisada (Vieira *et al.*, 2018; Galindo *et al.*, 2020; Ojo *et al.*, 2020; Milton *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022; Uniat *et al.*, 2022; Kozow *et al.*, 2023).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), estima que anualmente cerca de 600 milhões de pessoas adoecem por consumir alimentos contaminados por bactérias, vírus e parasitos, e 420.000 morrem desta mesma causa, constituindo um problema global de saúde (WHO, 2022). Neste contexto, as doenças parasitárias acometem mais de 407 milhões de pessoas, dos quais 91,1 milhões (22%) e 52 mil mortes estão associadas a contaminação de origem alimentar (WHO, 2015).

Entretanto, os casos de infecções parasitárias são comumente subnotificados, devido a dificuldades na investigação e determinação de agentes etiológicos, uma vez que envolve ciclos biológicos complexos, podendo ser de caráter zoonótico e/ou antroponótico ou ambos,

e ampla distribuição, exibindo longos períodos de incubação, dificultando o diagnóstico e intervenção clínica (Robertson, 2018; Teimouri *et al.*, 2021; Safadi *et al.*, 2023).

Ao contrário das bactérias, o método de cultura *in vitro* utilizado para investigação de surtos associados a DTHA, não pode ser usado para a detecção de parasitos, uma vez que, estes usualmente não se multiplicam fora de seus hospedeiros e, geralmente, são encontradas pequenas quantidades de formas infectantes (ovos, cistos e oocistos) em alimentos, podendo haver variações nos métodos de amostragem, procedimentos de preparação e detecção utilizados (Chalmers *et al.*, 2020; Chavez-Ruvalcaba, 2021). Entretanto, mesmo em pequenas concentrações nos alimentos, são capazes de ocasionar surtos, visto que a dose infectante necessária para causar infecção é considerada extremamente baixa, ao contrário de infecções por bactérias (Rousseau *et al.*, 2018; Mayelin *et al.*, 2020; Marques *et al.*, 2022).

Em adição, parasitos são muito resistentes a intempéries ambientais e processos de desinfecção, sendo os alimentos mais comuns associados a contaminação: leite não pasteurizado, sucos de frutas, frutas *in natura*, ou vegetais, os quais podem ser utilizados em formulações enterais (Shahnazi e Jafari-Sabet, 2010; Dumètre *et al.*, 2012; Epp *et al.*, 2019; Chalmers *et al.*, 2020).

Vale ressaltar que determinados parasitos transmitidos por alimentos como *Cryptosporidium* spp., *Cystoisospora belli*, *Cyclospora cayetanensis* e *Toxoplasma gondii* apresentam caráter oportunista, podendo acometer com maior gravidade indivíduos imunodeficientes ou imunocomprometidos, ocasionando quadros clínicos graves e prolongados (Perote, Vieira e Medeiros, 2014; Li *et al.*, 2020). Parasitoses, além de quadros de diarreia aguda ou crônica grave, podem ocasionar anemia por deficiência de ferro, desnutrição crônica, baixo crescimento em lactentes e outros distúrbios de saúde física e mental (Da Costa Dantas *et al.*, 2022).

Dado que, não há estudos que tenham avaliado a presença de parasitos em NED e o desafio de recuperar parasitos neste tipo de alimento, uma vez que, mescla vários tipos de ingredientes, como alimentos frescos, crus e cozidos em sua composição, ressalta-se a necessidade de avaliar protocolos que visem a detecção de parasitos em preparações enterais com alimentos crus para a padronização de um método.

Ainda, visto que a etapa de manipulação de formulações enterais é considerada a mais crítica devido ao risco de contaminação, é de extrema importância que haja um rígido

controle acerca da qualidade higiênica e monitoramento microbiológico e parasitológico de formulações enterais manipuladas, visando garantir a segurança dos alimentos para pacientes em Atenção Domiciliar (AD), que utilizam NED (Perote, Vieira e Medeiros, 2014; Viera *et al.*, 2018; Galindo *et al.*, 2020).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nutrição Enteral Domiciliar (NED) como Direito Humano à Alimentação Adequada (DHAA): continuidade do cuidado integral à Rede de Atenção à Saúde (RAS)

A NED pode ser definida como assistência nutricional e clínica ao paciente em seu domicílio, tendo como objetivo recuperar ou manter o nível máximo de saúde, funcionalidade e comodidade do paciente e está associada à redução de custos assistenciais. Envolve desde a terapia nutricional oral, a terapia nutricional enteral e parenteral (SBNPE, 2012).

Os primeiros serviços brasileiros de Atenção Domiciliar (AD), definidos como “modalidade de atenção à saúde integrada às Redes de Atenção à Saúde (RAS), caracterizada por um conjunto de ações de prevenção e tratamento de doenças, reabilitação, palição e promoção à saúde, prestadas em domicílio, garantindo continuidade de cuidados”, surgiram na década de 1960 como alternativa à internação hospitalar e à crise de lotação (Brasil, 2016a).

Em 19 de setembro de 1990, com o surgimento da Lei nº 8080, que cria o Sistema Único de Saúde (SUS), tendo como um dos princípios o processo de municipalização, considerando a universalidade do acesso e da integralidade da atenção, esses serviços foram multiplicados, sendo regulamentados no SUS em 2002, através da Portaria nº 373, de 27 de fevereiro (Brasil, 2002; Oliveira *et al.*, 2021).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução RDC nº 11, de 26 de janeiro de 2006, criou um regulamento técnico com o intuito de propor requisitos mínimos de segurança para o funcionamento de Serviços que prestam Atenção Domiciliar nas modalidades de Assistência e Internação Domiciliar para serem alcançados os resultados esperados, desde a indicação até a alta do paciente (Brasil, 2006).

Para efetivar a AD no SUS, vinculado à estratégia das RAS, foi criado o Programa Melhor em Casa (PMC), através da Portaria 2029, de novembro de 2011, a qual teve

sucessivas adequações até a normativa atual vigente, inserida na Portaria de Consolidação número 1, 5 e 6, de 28 de setembro de 2017. De acordo com dados da coordenação do PMC, em abril de 2020, o Programa contava com 583 municípios brasileiros habilitados, em 26 estados, cobrindo potencialmente 37% da população brasileira, por meio da atuação de 1.458 equipes multiprofissionais, o qual a cidade de Curitiba-PR está inclusa (Brasil, 2016b; Aanholt *et al.*, 2021).

A Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN) tem como propósito melhorar as condições de alimentação, nutrição e saúde da população brasileira, mediante a promoção de práticas alimentares adequadas e saudáveis, a vigilância alimentar e nutricional, a prevenção e o cuidado integral dos agravos relacionados à alimentação e nutrição, em busca da garantia da Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) (Brasil, 2013).

Considerando as diretrizes e objetivos do PNAN e do Sistema de Segurança Alimentar e Nutricional (SISAN), é possível dizer que a TND contribui para a garantia do Direito Humano à Alimentação Adequada e Saudável (DHAA), uma vez que engloba o acesso a alimentos para fins especiais, o respeito ao hábito individual e familiar, e o cuidado integral à saúde (Mazur *et al.*, 2014; Jansen *et al.*, 2014; Aanholt *et al.*, 2021).

2.2 Contaminação microbiológica de formulações enterais e Legislações vigentes que auxiliam na determinação de requisitos para análise da NE no Brasil

O risco de contaminação microbiana, a composição nutricional desconhecida e a falta de conhecimento sobre seus impactos clínicos podem ser alguns dos motivos de profissionais de saúde evitarem a prescrição de formulações enterais que incluem alimentos, apesar da crescente procura dos consumidores e seus resultados promissores (Brown, Zelig, Radler, 2020; Mezomo *et al.*, 2021).

Patógenos de origem alimentar, tem sido relacionado com quadros de diarreia de origem alimentar e associada à alimentação por sonda enteral, sendo os microrganismos mais comumente encontrados no sistema de NE as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Clostridioides difficile* e fungos (Ojo *et al.*, 2020). Indicadores bacteriológicos de contaminação fecal (IBCF) são considerados os principais parâmetros para determinar a qualidade de alimentos, a partir da análise de amostras que determinam limites aceitáveis ou

inaceitáveis frente a presença de microrganismos, englobando todos os setores de cadeia produtiva de alimentos no Brasil destinados ao consumo humano (Brasil, 2019).

Dentre as bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* pertencente à família Enterobacteriaceae, está entre as mais estudadas no mundo todo, sendo utilizada como um dos principais indicadores de contaminação fecal em diversos tipos de amostras (Jang *et al.*, 2017). A presença deste microrganismo em alimentos, reflete informações sobre as condições higiênicas, além de indicar potencial presença de enteropatógenos, que podem ser extremamente perigosos, principalmente para imunodeprimidos, que são mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções (Lima *et al.*, 2005).

S. aureus, bactéria Gram-positiva, coloniza a pele e membrana mucosa de humanos, sendo utilizado como indicador da qualidade de sanitização de estabelecimentos, principalmente quando envolve manipulação durante o processamento de alimentos, entretanto, toxinas produzidas por esta bactéria podem estar envolvidas em doenças específicas, como a síndrome do choque tóxico ou intoxicação alimentar estafilocócica (Bartels *et al.*, 2009; Benjelloun Touimi *et al.*, 2020). Embora se acredite que a produção de enterotoxinas geralmente esteja associada as cepas de *S. aureus*, outras espécies estafilocócicas coagulase-positivas também são conhecidas como produtoras de enterotoxinas (Moazen *et al.*, 2014).

Os aeróbios mesófilos são microrganismos indicadores frequentemente utilizados para verificar a qualidade microbiológica de alimentos, sendo capazes de crescer entre 20 e 45°C, e fornecerem informações valiosas sobre as condições sanitárias e higiênicas de processamento, armazenamento e distribuição, além de sugerir a presença de microrganismos deteriorantes e patogênicos (Freitas, Nero e Carvalho, 2009).

A Resolução RDC nº 503, de 27 de maio de 2021, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), dispõe sobre os requisitos mínimos exigidos para a Terapia de Nutrição Enteral, entre as quais é estabelecido o controle da qualidade microbiológica. Os limites microbiológicos para TNE, a qual se estende para NED são determinados para microrganismos aeróbios mesófilos, *Bacillus cereus*, coliformes, *E. coli*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. (Brasil, 2021).

Ademais, a RDC nº 623, de 9 de março de 2022, da ANVISA, dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância

e outras providências, a qual aborda que matérias estranhas indicativas de riscos à saúde humana são aquelas detectadas macroscopicamente e/ou microscopicamente, capazes de veicular agentes patogênicos para os alimentos e/ou de causar danos ao consumidor, abrangendo que, parasitos (helmintos e protozoários), devem se apresentar ausentes, em qualquer fase de desenvolvimento (Brasil, 2022).

A Resolução nº 623, não contempla requisitos para análise de NE, porém, por ser aplicada a toda a cadeia produtiva de alimentos também pode ser utilizada como um parâmetro para análise da qualidade da NE, somando-se à RDC específica.

2.2.1 Ocorrência de bactérias em formulações enterais manipuladas em domicílio

Nas últimas décadas observa-se maior demanda de pacientes que necessitam de Nutrição enteral em domicílio, sendo a gastroenterocolite por contaminação microbiológica a principal complicação infecciosa da TNE (Brasil, 2015; Epp *et al.*, 2019). Em paralelo, observa-se maior atenção e pesquisas aplicadas quanto a qualidade e segurança microbiológica de formulações enterais manipuladas em ambiente domiciliar (Carter *et al.*, 2018; Milton *et al.*, 2022) (Tabela 1).

Tabela 1: Estudos que avaliaram a contaminação microbiológica de formulações enterais manipuladas em domicílio.

Citação	Objetivo	Microorganismos pesquisados/encontrados	Principais achados	Conclusão
Kozow <i>et al.</i> , 2023	Realizar uma revisão sistemática da literatura para avaliar a contaminação microbiológica presente na alimentação por sonda enteral preparada em hospitais e/ou no domicílio	Aeróbios mesófilos, coliformes totais, <i>Bacillus cereus</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	44,67% das fórmulas enterais excederam a contagem bacteriana aceitável. As amostras de preparações enterais com alimentos apresentaram as maiores contagens bacterianas, seguidas pelas preparações mistas e pelas fórmulas comerciais	O risco à saúde do paciente ao consumir alimentação por sonda enteral preparada em hospitais ou em casa pode ser baixo, pois as bactérias presentes nas amostras não são consideradas potenciais causas de doenças, mas sim indicadores
Uniat <i>et al.</i> , 2022	Avaliar a qualidade microbiológica de formulações preparadas em casa (fórmula comercial, preparação mista e com alimentos)	Aeróbios mesófilos, bolores, leveduras, coliformes totais, coliformes fecais, <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp, <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva, <i>Bacillus cereus</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	72,81% das formulações enterais excederam a contagem bacteriana aceitável em pelo menos um dos microrganismos analisados	Os três tipos de formulações apresentaram resultados insatisfatórios comparado aos padrões brasileiros
Santos <i>et al.</i> , 2022	Discutir aspectos nutricionais, segurança alimentar e aspectos de segurança de preparações enterais utilizadas na nutrição enteral domiciliar	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus coagulase-negativa</i>	Quanto mais manuseio de comida ou o tempo de espera para consumo, maior a contaminação microbiológica	Preparações enterais mistas e fórmulas enterais comerciais não parecem atender todas as necessidades humanas (nutricionais e de segurança alimentar)

Ojo <i>et al.</i> , 2020	Comparar a qualidade microbiana de preparações enterais mistas e fórmula enteral comercial e avaliar o efeito de tempo de armazenamento em preparações enterais mistas	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , coliformes totais, aeróbios mesófilos, <i>Salmonella</i> spp., <i>L. monocytogenes</i> e <i>Pseudomonas</i> spp.	72,7% dos estudos relataram que o nível de contaminação microbiana de preparações mistas é superior ao padrão das diretrizes internacionais em comparação com fórmula comercial mistas	Existem níveis significativamente mais elevados de contaminação bacteriana em preparações enterais mistas em comparação com a fórmula comercial
Galindo <i>et al.</i> , 2020	Explorar as diferenças nas condições de higiene e carga microbiana de diferentes tipos de alimentação por sonda enteral caseira e explorar associações entre essas diferenças e características dos manipuladores de alimentos	Aeróbios mesófilos, <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva e coliformes totais	82,29% (n = 79) da alimentação por sonda enteral caseira ultrapassou a contagem bacteriana aceitável, no caso de pelo menos 1 dos microrganismos analisados	Independentemente do tipo de formulações enterais utilizadas pelos pacientes, quando manuseadas em domicílio, houve risco de contaminação
Milton <i>et al.</i> , 2020	Explorar a receita e o método de preparo utilizados em ambiente domiciliar e avaliar a carga microbiana de fórmulas enterais	Microrganismos aeróbios, <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e coliformes	88% das amostras atenderam aos critérios do US Food Code para consumo alimentar seguro; 10,7% atenderam às diretrizes de segurança marginal por outros padrões; e 1,3% excederam 105 UFC	Nenhuma amostra apresentou contagem microbiana aeróbia zero
Vieira <i>et al.</i> , 2018	Avaliar a qualidade nutricional e microbiológica de dietas enterais administradas em domicílio	Aeróbios mesófilos, <i>Escherichia coli</i> e coliformes totais	Apenas 6,0% das amostras estavam de acordo com o padrão para bactérias coliformes	Dietas enterais mistas entregaram menos de 50% dos valores prescritos e apresentaram altos níveis de contaminação bacteriana

Santos, Botoni, Morais, 2013	Avaliar as propriedades físicas, químicas, microbiológicas e nutricionais de dietas enterais padronizadas preparadas no domicílio de pacientes em terapia nutricional	Aeróbios mesófilos, <i>Escherichia coli</i> e coliformes totais	Aproximadamente 40% das dietas preparadas em domicílio apresentaram-se em desacordo com os padrões microbiológicos	O preparo das dietas nos domicílios apresentou boa reprodutibilidade; no entanto, a qualidade microbiológica ainda permanece uma questão preocupante
------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Alguns estudos que tinham como objetivo a determinação da carga microbiológica de formulações enterais manipuladas em domicílio (fórmulas enterais comerciais, preparações enterais mistas e preparações enterais com alimentos) identificaram a presença de microrganismos indicadores de contaminação fecal e em consequência, de condições higiênicas inadequadas, despertando dúvidas quanto à segurança no fornecimento destas dietas (Santos, Botoni, Morais, 2013; Galindo *et al.*, 2020).

Estudos de revisão sistemática apontam que, grande parte das amostras de nutrição enteral, seja comercial, preparações mistas ou com alimentos, apresentam percentuais significativos de contaminação bacteriana, excedentes aos limites bacteriológicos aceitáveis (Uniat *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2022; Kozow *et al.*, 2023).

Destaca-se que, independentemente da formulação enteral utilizada pode haver contaminação microbiológica, entretanto, com procedimentos seguros de manipulação de alimentos, seguindo as recomendações de boas práticas, pode minimizar a contaminação bacteriana na TNE, garantindo um ambiente domiciliar mais seguro (Madden *et al.*, 2019; Johnson *et al.*, 2018; Milton *et al.*, 2020;).

2.3 Ocorrência de parasitos como contaminantes de alimentos frescos no mundo e métodos de detecção

A OMS estima que doenças parasitárias ocasionam 48,4 milhões de casos e 59.724 mortes por ano, resultando em 8,78 milhões de DALYs (Anos de Vida Ajustados por Incapacidade), e estima-se que 48% dessas doenças parasitárias são transmitidas por alimentos (Torgerson *et al.*, 2015).

Em 2012, a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) em conjunto com a OMS, baseando-se em multicritérios, como a carga global de doenças, distribuição geográfica, morbidade associada, número de casos fatais, relevância e emergência e impactos econômicos em populações socialmente vulneráveis, publicou um ranking de acordo com a classificação de risco de contaminação por parasitos de origem alimentar (FAO/OMS, 2014).

Dentre os parasitos associados a contaminação de produtos frescos e de maior risco à saúde humana, os helmintos ocupam as primeiras posições, sendo: 1º *Taenia solium*, 2º

Echinococcus granulosus e 3º *E. multilocularis*, destacando *Ascaris* spp. na nona posição. Logo, os protozoários *T. gondii*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*, *G. duodenalis*, *Cyclospora cayetanensis* e *Balantioides coli*, são citados como os mais relevantes (FAO/OMS, 2014).

Parasitas transmitidos por alimentos, saíram de uma posição negligenciada para emergente, o qual o tema “doença emergente” pode ser definido como aquela que nunca foi identificada anteriormente, ou devido a um aumento inesperado na incidência da doença em uma área, ou espécie onde foi previamente diagnosticada (Robertson, 2018).

Surtos de origem alimentar, tem sido comumente associado ao consumo de frutas e vegetais contaminados por helmintos e protozoários, sendo *Ascaris lumbricoides*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii* e *Cyclospora cayetanensis*, os helmintos e protozoários mais reportados (Marques *et al.*, 2022; Da Costa Dantas *et al.*, 2022; Khan *et al.*, 2022).

Devido aos impactos sobre a saúde e o crescente número de DTHA ocasionados por parasitos intestinais, especialmente em produtos frescos, este tema tem sido cada vez mais abordado por pesquisadores de diversos países, incluindo o Brasil, na tentativa de identificar contaminações por parasitos nestas matrizes e o melhor método de detecção (Tabela 2).

Tabela 2: Estudos que avaliaram a contaminação por parasitos em produtos frescos no Brasil e no mundo.

Citação	Local	Objetivo	Metodologia de detecção	Resultado
Safadi <i>et al.</i> , 2023	Norte do Líbano	Avaliar a contaminação parasitária para fornecer informações que possam ser utilizadas em pesquisas futuras ou em combinação com outras descobertas para informar a saúde pública e implementar a agricultura	Lavagem com solução salina de formalina a 10%, agitação em Stomacher®, sedimentação e análise em microscópio óptico utilizando técnicas de identificação de montagem úmida com solução salina e iodo	<i>Blastocystis</i> spp. e <i>Ascaris</i> spp. foram os parasitos mais frequentemente detectados nas hortaliças, sendo encontrados em 8,7% e 3,7% das amostras, respectivamente
Bilgiç <i>et al.</i> , 2023	Izmir, Turquia	Avaliar a contaminação parasitária de hortaliças que foram à venda nos mercados locais	Lavagem com solução salina fisiológica (NaCl 0,85%), agitação mecânica, sedimentação e análise microscópica, método de placa ágar e PCR	26,2% das hortaliças examinadas apresentavam algum tipo de contaminação parasitária
Oladosu <i>et al.</i> , 2023	Iwo, Sudoeste da Nigéria	Determinar a presença de parasitos e bactérias em frutas comercializadas nos dois principais mercados da cidade de Iwo	Lavagem com solução salina fisiológica (NaCl 0,9%), sedimentação e análise microscópica	Dos parasitos detectados neste estudo, <i>Ascaris lumbricoides</i> foi mais prevalente do que qualquer outro parasito encontrado
Moreno-Mesonero <i>et al.</i> , 2023	Espanha	Determinar a ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Giardia</i> spp., <i>E. histolytica</i> , <i>T. gondii</i> , <i>C. cayetanensis</i> , <i>Blastocystis</i> sp., <i>Acanthamoeba</i> spp. e <i>Vermamoeba vermiformis</i> em vegetais orgânicos de folhas verdes e morangos	Lavagem com Tween 80 a 0,1% (folhas verdes), Glicina 1M (morangos), IMS e qPCR	65,5% amostras positivas para <i>Acanthamoeba</i> spp., 1,8% para <i>Blastocystis</i> sp., 12,7% para <i>C. cayetanensis</i> , 37,2% para <i>T. gondii</i> , 17,3% para <i>V. vermiformis</i> , 6,8% para <i>Cryptosporidium</i> spp. e 1,7% para <i>Giardia</i> spp.

Marques <i>et al.</i> , 2022	Portugal e Espanha	Presença de protozoários zoonóticos <i>G. duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. em vegetais frescos	IMS, RID, PCR e microscopia de luz	<i>G. duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. em 25% das amostras
Trelis <i>et al.</i> , 2022	Valência, Espanha	Ocorrência de <i>G. duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. (oo) cistos em hortaliças de folhas verdes	Métodos parasitológicos, dois qPCR em tempo real e microscopia de luz	<i>G. duodenalis</i> em 23,0 % das amostras e <i>Cryptosporidium</i> spp. em 7,8%
Khan <i>et al.</i> , 2022	Paquistão	Avaliação da contaminação parasitária de hortaliças vendidas em mercados	Lavagem em soro fisiológico, agitação mecânica, sedimentação e análise microscópica	<i>Ascaris lumbricoides</i> em 12,3% das amostras
Barlaam <i>et al.</i> , 2022	Itália	Detectar a presença e investigar a prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>G. duodenalis</i> em saladas mistas embaladas e em frutas silvestres locais	Lavagem com Alconox 1%, microscopia (FLOTAC) e nested - PCR	<i>Cryptosporidium</i> spp. em 27 pools (15 saladas e 12 frutas vermelhas) e <i>G. duodenalis</i> em 25 pools (13 de salada e 12 de frutas vermelhas)
Temesgen, Stigum e Robertson, 2022	Noruega	Preencher a lacuna de conhecimento sobre o estado de contaminação parasitária de frutos de baga vendidas no mercado norueguês	Lavagem com Alconox 1% e qPCR	<i>T. gondii</i> , <i>C. cayetanensis</i> e <i>Cryptosporidium</i> spp. em 2,9% (24/820), 6,6% (52/820) e 8,3% (68/820) das amostras, respectivamente

Hajipour <i>et al.</i> , 2021	Tabriz, Irã	Análise parasitológica de vegetais na etapa de cultivo prontos para consumo	<p>Pesquisa de coccídios: Ziehl-Neelsen modificado. Outros protozoários helmintos: lavagem em solução salina fisiológica (NaCl 0,95%), flutuação em sulfato de zinco</p>	<p><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></p>
Barlaam <i>et al.</i> , 2021	Itália	Investigação de <i>Cyclospora cayetanensis</i> , <i>T. gondii</i> e <i>Echinococcus</i> spp em produtos frescos	Lavagem com Alconox 1%, microscopia (FLOTAC) e PCR	<i>C. cayetanensis</i> e <i>E. multilocularis</i>
Rodrigues <i>et al.</i> , 2020	Belém, Brasil	Prevalência de contaminação por parasitos intestinais em alface e coentro comercializado em feiras livres e supermercados	Lavagem com detergente neutro diluído em água destilada e sedimentação espontânea	Ovos de helmintos e/ou larvas e/ou cistos de protozoários foram detectados em 89% (89/100) das alfaces e 86% (86/100) de coentro
Maldonado <i>et al.</i> , 2019	Brasília, Brasil	Análise parasitológica de diversos vegetais prontos para o consumo	Lavagem em água destilada e análise do sedimento por lugol	<i>Entamoeba</i> sp., <i>Balantidium coli</i> , Ancilostomatídeos, <i>Strongyloides</i> sp., <i>Ascaris</i> sp., <i>Trichuris</i> sp.
Machado <i>et al.</i> , 2018	Brasil, regiões norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul	Avaliação parasitológica de hortaliças folhosas comercializadas em mercados atacadistas públicos	Lavagem com água destilada e escova, sedimentação e análise microscópica com lugol	Todas as feiras livres comercializavam hortaliças contaminadas com <i>Entamoeba</i> sp., <i>Balantidium coli</i> , <i>Strongyloides</i> sp., <i>Ascaris</i> sp., <i>Enterobius vermicularis</i> e ovos de Ancilostomatídeo

Caradonna <i>et al.</i> , 2017	Itália	Contaminação por <i>G. duodenalis</i> , <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>T. gondii</i> e <i>Cyclospora</i> <i>cayetanensis</i> , em saladas 'prontas para comer'	Lavagem com Tween 80 a 0,1%, PCR e microscopia de luz	0,6% para <i>G. duodenalis</i> , 0,8% para <i>T. gondii</i> , 0,9% para <i>Cryptosporidium</i> spp., e 1,3% para <i>C. cayetanensis</i>
Rafael <i>et al.</i> , 2017	Maringá, Brasil	Ocorrência de <i>G. duodenalis</i> em vegetais diversos orgânicos e não orgânicos	Lavagem com Tween 80, filtração em membrana e PCR e PCR-RFLP	7,3% de contaminação por <i>G.</i> <i>duodenalis</i>
Rostami <i>et al.</i> , 2016	Mazandaram, Norte do Irã	Prevalência de contaminação por helmintos transmitidos pelo solo em vegetais	Lavagem com éter formalina	<i>A. lumbricoides</i> (3,36%), <i>T.</i> <i>trichiura</i> (2,2%), ancilostomídeos (2,9%), <i>Toxocara</i> spp. (1,68%), <i>Trichostrongylus</i> spp. (1,55), <i>Taenia</i> spp. (0,9%) e <i>Hymenolepis</i> <i>nana</i> (2,2%)

* **Legenda:** IMS = separação imunomagnética; RID = reação de imunofluorescência direta; PCR = reação em cadeia da polimerase; qPCR = PCR quantitativo; PCR-RFLP = PCR polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição.

Apesar de haver diretrizes e regulamentações que abordem a importância de rastreamento e monitoramento de protozoários em alimentos frescos, há falhas nos sistemas de detecção e vigilância, podendo ser atribuído à ausência de metodologias consensuais e precisas para sua identificação (Marques *et al.*, 2022).

Em grande parte dos estudos, como observado na tabela 2, a pesquisa por parasitos em matrizes vegetais é realizada por metodologias adaptadas da rotina clínica que envolvem lavagem com água, soro ou detergentes, sedimentação espontânea ou flutuação e análise microscópica (Rostami *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2020; Machado *et al.*, 2018; Maldonado *et al.*, 2019; Hajipour *et al.*, 2021; Lacerda, Paixão Filho e Matos, 2020; Khan *et al.*, 2022).

Porém, a utilização de métodos adaptados da rotina clínica pode não ser o suficiente para detecção de helmintos e protozoários em matrizes alimentares, sendo necessário a utilização de técnicas mais robustas, como imunológicas e moleculares, especialmente para detecção de protozoários patogênicos (Cook *et al.*, 2006; Razak *et al.*, 2017).

Para a detecção e enumeração de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*, (principais protozoários causadores de gastroenterite em seres humanos), associados como contaminantes biológicos de vegetais verdes folhosos frescos e frutos de baga, existe a ISO n° 18744, publicada em 2016. Esta estabelece um padrão internacional para a detecção de suas formas infectantes através da lavagem com solução de glicina, utilização de técnicas de concentração, purificação por separação imunomagnética e visualização dos protozoários, mediante emprego de anticorpos monoclonais e reação de imunofluorescência direta (ISO 18744, 2016). Porém, este método, não contempla análises moleculares para determinação de espécies, genótipos ou grupos genéticos potencialmente patogênicos a seres humanos (ISO 18744, 2016).

Entretanto, embora investigações ao redor do mundo apontem a frequente contaminação de hortifrutis por helmintos e o surgimento de surtos alimentares, não existe ISO que preconize a metodologia mais adequada para seu isolamento em alimentos frescos ingeridos crus (Rodrigues *et al.*, 2020; Hajipour *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2021).

Em uma visão geral das formas de identificação de parasitos em alimentos, estudos apontaram, que muitos métodos e protocolos diferentes têm sido aplicados para frutas e hortaliças, indicando a mesma falta de padronização, uma vez que, estes alimentos podem

apresentar padrões muito diferentes de contaminação, a depender de suas matrizes (Maia *et al.*, 2022; Temesgen, Stigum e Robertson, 2022). Desta forma, se faz necessário uma ferramenta de detecção padronizada e validada para melhorar a capacidade de avaliação de risco para helmintos e protozoários transmitidos por alimentos (Chalmers *et al.*, 2020; Saelens, Robertson e Gabriel, 2022)

Nos últimos anos, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de padronizar novos métodos de detecção em produtos frescos (Khan *et al.*, 2022).

Matosinhos *et al.* (2016) e Pineda *et al.* (2021), realizaram validações em vegetais folhosos, na tentativa de preencher esta lacuna. Em ambas as padronizações, foi utilizada a solução de dissociação Glicina 1M pH 5,5 e ovos de *Ascaris suum* como modelo, devido a facilidade de obtenção de fêmeas desta espécie e sua forte relação com doenças transmitidas por alimentos (OMS, 2015; Pineda *et al.*, 2021).

Em 1980, o químico francês H. Branconnot foi pioneiro ao isolar a glicina de ácidos hidrolisados de proteínas (Razak *et al.*, 2017). Seu nome é derivado da palavra grega “glyks”, devido a sua natureza doce e seu sabor ser semelhante ao do açúcar. A glicina é produzida pela hidrólise alcalina de carne e gelatina com hidróxido de potássio, sendo sua estrutura sintetizada quimicamente a partir do ácido monocloroacético e da amônia (Wang *et al.*, 2013). Suas características tensoativas, permitem interagir com cistos, oocistos e ovos de helmintos, que podem estar fortemente aderidos a matrizes vegetais, facilitando sua remoção (Cook *et al.*, 2006; Cook *et al.*, 2007; Matosinhos *et al.*, 2016).

Shields e colaboradores (2012), observaram que em meio a composição do Alconox[®], contém um surfactante denominado dodecilbenzenossulfonato de sódio (C₁₂H₂₅C₆H₄SO₃Na), encontrado em detergentes utilizados para lavagem de roupas, e pirofosfato tetrassódico (Na₄P₂O₇), um aditivo alimentar com propriedades emulsionantes e dispersantes. A mistura destes dois compostos coincide em promover a remoção de oocistos da superfície de folhas verdes (Chandra *et al.*, 2014).

Ressalta-se que para formulações enterais diversas, não há até o presente momento nenhum estudo que tenha validado um protocolo ou aferido a eficiência de recuperação de ovos de helmintos mediante utilização de soluções de dispersão contendo surfactantes ou aminoácidos, em situação artificial de contaminação.

2.4 *Ascaris* spp. e ascaridiose

De acordo com a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) e a OMS, em países em desenvolvimento e emergentes, incluindo o Brasil, helmintos transmitidos pelo solo (HTS) e por alimentos contaminados destacam-se pelo amplo poder de disseminação e agravos à saúde (PAHO, 2016).

As infecções por HTS são as doenças tropicais negligenciadas mais prevalentes em todo o mundo (Le *et al.*, 2024). Estima-se que em torno de 1,5 milhões de pessoas estejam infectadas com ao menos um dos HTS, enquanto cerca de 5,3 milhões estão sob o risco de infecção (Jourdan *et al.*, 2018).

Suas complicações estão comumente associadas a quadros de diarreia, anemia, desnutrição, atraso no desenvolvimento infantil, causando morbidade e mortalidade substanciais (Specht e Keiser, 2023).

Dentre os HTS, *Ascaris* sp., é um dos patógenos entéricos mais significativos, sendo comumente utilizado como indicador parasitológico, estando no topo da lista de classificação de risco para parasitos de origem alimentar (Else *et al.*, 2020).

Os vermes adultos de *A. lumbricoides* (humanos) e *A. suum* (suínos) são morfologicamente indistinguíveis e ainda existe muito debate se representam espécies distintas ou unidades taxonômicas operacionais que são reprodutivamente isoladas ou são capazes de cruzar, produzindo descendentes viáveis (Betson *et al.*, 2013). Além disso, a extensão da transmissão entre hospedeiros suínos e humanos ainda não é clara (Chavez-Ruvalcaba *et al.*, 2021).

A ascaridiose é uma infecção de distribuição global, sendo considerada um problema de saúde pública mundial, atingindo aproximadamente 1 bilhão de pessoas e ocasionando 60 mil mortes por ano (Torgerson *et al.*, 2015). Ademais, é comumente associado aos casos de doenças transmitidas por alimentos - sendo os alimentos mais contaminados as saladas e vegetais consumidos crus - ocasionando 12 milhões de casos, 2.700 mortes e ainda responsável por 1.315,00 DALYs em todas as faixas etárias e em ambos os sexos (Amahmid *et al.*, 2023).

Além dos alimentos, a infecção por *A. lumbricoides* ocorre pela ingestão de ovos embrionados por meio de água e solo contaminados. As larvas migram através do fígado e

do pulmão, culminando com o término de seu desenvolvimento, gerando vermes adultos no intestino delgado. A fêmea produz grande quantidade de ovos que são eliminados pelas fezes (Akanksha *et al.*, 2023).

Pacientes infectados podem ser assintomáticos, apresentando apenas manifestações a longo prazo de retardo de crescimento e desnutrição, que pode acarretar má absorção de vitamina A, gordura, proteínas e certos açúcares, juntamente com anorexia induzida pela infecção (Scott, 2008).

Quando a sintomatologia está presente, as manifestações mais comuns versam sobre dor abdominal, distensão abdominal, náuseas, vômitos e diarreia. Ainda, se o número de larvas que passam pelo pulmão for significativo, pode-se observar quadros de pneumonia, e eosinofilia (também conhecida como síndrome de Löeffler) (Holland, 2013). Os sinais e sintomas incluem sibilos, dispneia, tosse, hemoptise e febre (De Lima e Horrall, 2020).

Em situações de alta carga parasitária, os vermes adultos podem migrar para estruturas tubulares, como o sistema biliar e pancreático, causando colecistite, colangite, pancreatite, obstrução do intestino delgado, vôlvo, apendicite e intussuscepção (De Lima e Horrall, 2020). As crianças são mais suscetíveis a complicações do que os adultos, onde em áreas endêmicas, o comprometimento cognitivo está frequentemente associado à infecção por *Ascaris* (Holland *et al.*, 2022).

Ademais, a biologia e morfologia dos ovos os torna adequados para transmissão fecal-oral devido à enorme quantidade de ovos eliminados por indivíduos parasitados, baixa dose infectante, pequeno tamanho e longa permanência no ambiente (Amahmid *et al.*, 2023).

Devido a estrutura robusta dos ovos de *Ascaris* sp., além de o permitir suportar condições climáticas adversas, tanto no ambiente quanto em alimentos, os processos de higienização comumente utilizados nas indústrias e residências, envolvendo agentes químicos, (como o hipoclorito de sódio a 1,5%) não são eficazes para a sua remoção ou inativação quando presente em alimentos frescos como as hortaliças (Fidjeland *et al.*, 2015; Amoah *et al.*, 2017; Silveira *et al.*, 2023).

Estes fatores são preocupantes, considerando a epidemiologia acerca da ascariíose, especialmente quando envolve o âmbito domiciliar, onde há relatos de contaminação de alimentos e mínima vigilância sanitária. Portanto, enfatiza-se a relevância do desenvolvimento de novas padronizações de metodologias para a busca ativa da

contaminação por ovos de helmintos em alimentos frescos, bem como de soluções sanitizantes preferencialmente naturais para a sua remoção (Matosinhos *et al.*, 2016; Silveira *et al.*, 2023).

2.5 *Cryptosporidium* spp., e criptosporidiose

Cryptosporidium é um parasito protista unicelular e membro do filo Apicomplexa, classe Gregarinomorpha, ordem Cryptogregarida, família Cryptosporidiidae, capaz de se replicar tanto assexuadamente quanto sexuadamente em ampla gama de hospedeiros vertebrados, apresentando um ciclo biológico do tipo monoxênico (English *et al.*, 2022).

É um protozoário gastrointestinal obrigatório, que após sucessivas merogonias e gametogonias em enterócitos intestinais, culmina com a produção de dois tipos de estruturas altamente infectantes (oocistos) – parede fina e espessa, sendo estes últimos, eliminados nas fezes (Chalmers *et al.*, 2019; Santin, 2020). Cada oocisto contém quatro esporozoítos e pode sobreviver por meses em condições ambientais adversas sendo resistente à desinfecção com cloro e seus derivados (Ahmed e Karanis, 2018).

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp., são excretados em números significativamente maiores do que a dose padrão média para o início da infecção humana (10 oocistos) apresentando alta resistência à processos variados de desinfecção (Bourli *et al.*, 2023).

Os seres humanos podem ser infectados pela via fecal-oral, através da ingestão imediata de oocistos em água ou alimentos contaminados, por contato direto com animais, pessoa-pessoa ou de modo indireto por contato com superfícies e objetos contaminados (Hancock-Allen *et al.* 2017).

Em 1976, *Cryptosporidium* spp., foi identificado como causador de dois casos de gastroenterite humana, e a importância veterinária em ruminantes foi reconhecida, após exame histológico (Santin, 2020). Logo, em 1980, ganhou mais visibilidade com a pandemia de HIV/AIDS, uma vez que, esses pacientes são suscetíveis a criptosporidiose grave, intratável e às vezes fatal (Chalmers *et al.*, 2019).

O reconhecimento do impacto na população em geral seguiu-se a grandes surtos de água potável, destacando que os fornecimentos que cumprem as normas de qualidade da

Organização Mundial de Saúde (baseados em *Escherichia coli*) podem apresentar um risco de criptosporidiose (Chalmers *et al.*, 2019). Estudos de infecciosidade humana e modelos dose-resposta confirmaram a importância da transmissão via água potável contendo um pequeno número de oocistos, levantando que as probabilidades de infecção por apenas um oocisto podem chegar a 72% (Messner, Berger, 2016).

Sua distribuição é cosmopolita, sendo endêmico em países em desenvolvimento, onde a prevalência varia de 4% a 22,8% na América do Sul, incluindo o Brasil e Venezuela, sendo que, muitos casos ainda não são diagnosticados e notificados (Vanathy *et al.*, 2017). A prevalência global de infecção por *Cryptosporidium* spp., em pessoas é estimada em 7,6% (Dong *et al.*, 2020). Nos países de rendimento elevado, a prevalência varia entre 0,1 e 14,1%, com uma estimativa média de 4,3%, enquanto nos países de baixo rendimento a prevalência varia entre 1,3 e 31,5% e uma estimativa média de 10,4% (Garcia e Hayman, 2023).

Embora seja relatado que *Cryptosporidium* spp., está presente em 1% das fezes de indivíduos imunocompetentes em países de alta renda, o patógeno é detectado em 5-10% das fezes de pessoas em países de baixa renda (Checkley *et al.*, 2015). Entretanto, a imensa maioria dos surtos de veiculação hídrica e alimentar são notificados em países desenvolvidos (Ma *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, surtos de criptosporidiose de origem alimentar tem sido relacionado principalmente com produtos frescos, leite e derivados não pasteurizados e suco de frutas (Chalmers *et al.*, 2020). Ainda, a cada 120 casos de contaminação hídrica ocasionados por *Cryptosporidium*, 46% estão ligados a fonte de água potável, sendo considerado o principal agente causador de surtos de transmissão hídrica (Bourli *et al.*, 2023).

Atualmente, existem 44 espécies conhecidas de *Cryptosporidium*, onde em torno de 20 espécies distintas causam infecções moderadas ou graves em humanos, sendo as principais *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis* (Feng, Ryan e Xiao, 2018; Mamedova e Karanis, 2021).

As espécies deste parasito são importantes patógenos humanos e os principais causadores de diarreia e mortalidade no mundo, acometendo principalmente adultos e crianças, indivíduos imunossuprimidos como transplantados, que utilizam terapias por corticosteroides e portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) que não realizam tratamento adequado (Li *et al.*, 2020; Chavez-Ruvalcaba *et al.*, 2021).

O grau de severidade da infecção varia de acordo com a espécie e subtipos, idade e estado imunológico do hospedeiro onde em pessoas imunocompetentes pode ocorrer infecção autolimitada com diarreia aguda, e em imunocomprometidos, diarreia crônica, de longa duração e exibir caráter oportunista, com risco de vida (Xiao *et al.*, 2004).

Em grupos mais vulneráveis, como transplantados, leucêmicos, e em tratamento contra o câncer, o quadro de diarreia crônica pode durar mais de dois meses ou casos fulminantes com eliminação de volumes superiores a 2L de fezes aquosas/dia (Bouzid *et al.*, 2018; Ahmadpour *et al.*, 2020). Em indivíduos imunocomprometidos pode ainda despertar manifestações extra intestinais, em tecidos hepatobiliares, pulmonares e pancreáticos (Chalmers *et al.*, 2019).

As sequelas a longo prazo após a doença aguda são cada vez mais relatadas, incluindo distúrbios gastrointestinais, síndrome do intestino irritável (SII) ou sintomas semelhantes à SII (Carter *et al.*, 2018).

Em pessoas imunocompetentes, são descritas sequelas pós-infecciosas não muito diferentes daquelas que se seguem à gastroenterite bacteriana (Chalmers *et al.*, 2019).

A complexidade da criptosporidiose, o número de surtos e o desafio e limitação quanto ao seu tratamento, reforça ainda mais o porquê de ser considerado um problema de saúde pública, uma vez que, a Nitazoxanida é o único medicamento aprovado pelo FDA e apenas para uso pediátrico, onde sua eficácia é considerada mínima em imunocompetentes e não eficaz em indivíduos imunocomprometidos infectados (Relat e O'connor, 2020).

2.6 *Giardia* spp., e giardiose

O protozoário *Giardia* spp., é comum em humanos e vários animais. Seu ciclo de vida inclui dois estágios principais, o trofozoíto e o cisto, onde os cistos são excretados em grandes quantidades nas fezes de hospedeiros infectados (Einarsson *et al.* 2016). O cisto infeccioso formado no intestino grosso dos hospedeiros, é relativamente resistente a desinfetantes e à degradação ambiental (Dixon, 2021).

Sua transmissão ocorre pela via fecal-oral e pode ter caráter direto (interpessoal ou zoonótica) ou indireto, através da ingestão de cistos presente em água tratada, água bruta ou

recreacional cloradas, e em alimentos como mariscos, produtos lácteos, frutas e vegetais frescos (Leal *et al.*, 2013; 2018; Ryan *et al.*, 2019).

Alguns grupos estão mais expostos ou vulneráveis à aquisição da giardiose, como bebês, crianças em creches, profissionais de cuidados infantis, àqueles em contatos próximos com pessoas e animais infectados, indivíduos institucionalizados, que bebem água contaminada ou recreativa, viajantes para áreas endêmicas, indivíduos com fibrose cística, hipocloridria e que praticam sexo oral-anal (Leung *et al.*, 2019).

Os fatores que contribuem para o sucesso da propagação da *Giardia* spp., incluem: um - grande número de cistos liberados no ambiente por hospedeiros infectados; dois - cistos que são imediatamente infecciosos após a excreção e que permanecem viáveis por um longo período sob condições ambientais favoráveis (baixa temperatura e umidade) e três - baixa dose infectante (Santin, 2020).

A giardiose, causada pela espécie *G. duodenalis*, é considerada a causa de quadro diarreico mais comum em humanos, acometendo em torno de 280 milhões de pessoas todos os anos (Einarsson *et al.*, 2016). O quadro clínico é variado, podendo a doença ser subclínica, aguda ou crônica (Cai *et al.*, 2021). Sequelas pós-infecciosas de longo prazo em pacientes que nunca receberam tratamento anteriormente, como má absorção e déficit de crescimento em crianças também são reportadas (Caccio, Lale e Svard, 2018).

Além do quadro de diarreia, distensão abdominal, má absorção e perda de peso são sintomas da giardiose (Einarsson *et al.*, 2016). As infecções podem ser leves até casos graves, ocasionando quadros crônicos de alergias alimentares, síndrome do intestino irritável (SII), fadiga e artrite (Bartelt, Platts-Mills, 2016). Infecções sintomáticas e mais graves ocorrem com mais frequência em crianças, especialmente com imunodeficiência, sendo a astenia, dor abdominal, desidratação e desequilíbrio eletrolítico as manifestações comuns (Leung *et al.*, 2019).

Ainda, a fisiopatologia da doença pode desencadear a intolerância à lactose, originando o desequilíbrio na microbiota intestinal e em consequência, a disbiose, seguido de má absorção de proteínas, gorduras, vitaminas lipossolúveis e minerais (especialmente vitamina A, E, B12, ferro, zinco e folato) (Astiazaran-Garcia *et al.*, 2010).

G. duodenalis é um dos principais protozoários associados as doenças transmitidas por ingestão hídrica e alimentar, sendo incluído em 28,2 milhões de casos envolvendo

alimentos e 26.270 anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) (OMS, 2015). A FAO (*Food and Agriculture Organization*) junto da OMS, classificaram *G. duodenalis*, na 11ª posição entre os 24 parasitos de origem alimentar no ranking publicado em 2014 (FAO/OMS, 2014).

A giardiose faz parte da iniciativa de doenças negligenciadas da OMS desde 2004, sendo especialmente comum em áreas com saneamento precário e instalações limitadas de tratamento de água (Ankarklev *et al.*, 2010). Considera-se que as taxas de infecção em países de baixo e médio rendimento são muito mais elevadas do que as dos países de elevado rendimento, variando entre 8,0 e 30,0% e 0,4 a 7,5%, respectivamente (Cai *et al.*, 2021). No Brasil, a giardiose é considerada endêmica e alguns estados apresentam prevalência superior a 30%, como o estado do Paraná (Coelho *et al.*, 2017).

Ainda no Brasil, *Giardia* spp., é mais frequentemente detectada em amostras hídricas e alimentares nas regiões sudeste e sul, entretanto, a epidemiologia ambiental e especialmente a epidemiologia molecular, para o entendimento das fontes de contaminação, bem como para a sua rastreabilidade ainda apresenta ampla defasagem (Fantinatti *et al.*, 2020; Rondello Bonatti *et al.*, 2023, Leal *et al.*, 2024).

Porém, considerando as falhas no sistema de detecção e vigilância em muitas partes do mundo, é provável que muitos casos envolvendo transmissão alimentar ainda sejam subnotificados, significando que a prevalência pode ser muito maior do que o divulgado (Ryan *et al.*, 2019).

Até o momento, são conhecidas nove espécies de *Giardia*, a qual *Giardia duodenalis*, sinonímia *lamblia* e *intestinalis*, é responsável por infectar humanos, sendo um complexo de espécies composto por oito assembleias (A-H) (Ryan *et al.*, 2021).

As assembleias A e B são os conjuntos prevalentes em humanos e as subassembleias AI e AII também tem sido identificada (Ryan *et al.*, 2019). As assembleias de C-H são hospedeiros específicos, porém, há poucos relatos de infecção humana (Feng e Xiao, 2011; Ryan *et al.*, 2021). Os genótipos (assembleias) C e D são relatadas principalmente em canídeos, E em ungulados, F em felinos, G em roedores e H em focas (Barbosa *et al.*, 2024). Acredita-se que apenas os dois conjuntos A e B são patogênicos para humanos, porém, há relatos de infecção humana com assembleias C, D, E e F (Zahedi *et al.*, 2017; Caccio, Lale e Svard, 2018).

Atualmente, existem vários fármacos disponíveis para o tratamento de infecções por *Giardia duodenalis*., sendo os derivados da classe nitroimidazol os mais utilizados, e derivados da classe benzinidazol (Ryan *et al.*, 2019). Mas apesar dessas opções, não há um consenso em relação ao uso desses fármacos, pois todos eles apresentam algum efeito adverso, podem agir na microbiota intestinal, apresentar algum potencial carcinogênico ou até mesmo induzir o desenvolvimento de resistência pelo parasito, principalmente pela classe dos nitroimidazois (Silva *et al.*, 2020).

2.7 *T. gondii* e Toxoplasmose

T. gondii pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, subclasse Coccidiasina, ordem Eimeriorina e família Toxoplasmatidae, tendo seu nome derivado da forma crescente do estágio taquizoíta (toxon = arco, plasma = forma) (Hill e Dubey, 2016).

É considerado um protozoário coccídeo intracelular obrigatório que infecta até um terço da população mundial, sendo considerado um dos parasitos mais comuns em humanos e animais de sangue quente, como aves e mamíferos (Rousseau *et al.*, 2018).

A infecção é geralmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, mas pode causar quadros graves em indivíduos imunocomprometidos e ser especialmente grave para fetos e recém-nascidos se adquirida durante a primo-infecção da gestante (Marques *et al.*, 2022).

Até o momento, 287 genótipos foram descritos e sua transmissão pode ocorrer de três formas: vertical – transmissão da mãe para o feto, ingestão de cistos em tecidos de animais infectados em carne crua ou mal cozida e ingestão de oocistos - em água, alimentos ou contato com o solo contaminado, eliminados por membros da família Felidae infectados (Chavez-Ruvalcaba *et al.*, 2021).

Existem três estágios infectantes de *T. gondii* para todos os hospedeiros: esporozoítos (em oocistos esporulados como forma ambientalmente resistente), taquizoítos (individualmente ou em grupos e com rápida multiplicação) em líquidos corpóreos e com capacidade de atravessar a barreira transplacentária e bradizoítos (cistos teciduais com multiplicação lenta (Shapiro *et al.*, 2019). Em seu ciclo de vida complexo, os felídeos podem eliminar milhões de oocistos não esporulados que necessitam passar de 1-5 dias no solo para

tornar-se infectantes (Opsteegh *et al.*, 2024). Normalmente a primo infecção de gatos jovens decorre da predação de roedores parasitados mediante ingestão de um único cisto tecidual contendo bradizoítos, sendo que muitos cistos teciduais podem estar presentes em um camundongo infectado (Hill e Dubey, 2002).

Os oocistos esporulados sobrevivem por longos períodos nas condições ambientais mais comuns e até mesmo em ambientes adversos durante meses e até anos (Dardona *et al.*, 2021). No solo, os oocistos podem ser transmitidos mecanicamente por invertebrados como moscas, baratas, escaravelhos e minhocas, que podem espalhar os oocistos na alimentação humana e animal (Hill e Dubey, 2016).

Surtos de toxoplasmose tem se tornado cada vez mais comuns, sendo relacionados com a ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos de fezes de gatos infectados (Ekman *et al.*, 2012). As taxas de soropositividade variam de menos de 10% a mais de 90%, sendo sua incidência anual a nível mundial estimada em 19.100 novos casos (Wang *et al.*, 2017). A contaminação de hortaliças e frutas com *T. gondii* pertencentes aos genótipos Tipo I e II, já foi observada em diversos países, como o Brasil, China, Itália e Polônia (Li *et al.*, 2020).

A toxoplasmose continua a ser um problema significativo de saúde pública nos Estados Unidos, onde 8 a 22% das pessoas estão infectadas, sendo observada uma prevalência semelhante no Reino Unido (Jones *et al.*, 2014). Na América Central, América do Sul e Europa continental, as estimativas de infecção variam de 30 a 90% (Hill e Dubey, 2016). No Brasil, existe uma taxa muito alta de infecção por *T. gondii* em humanos, 50% das crianças da escola primária e 50-80% das mulheres em idade fértil têm anticorpos contra o *T. gondii* (Valenzuela *et al.*, 2019).

Ferreira *et al.* (2018) relataram que dos 25 surtos registrados no Brasil nos últimos 50 anos, 56% (14/25) ocorreram entre 2010 e 2018, onde setenta e dois por cento (18/25) tiveram ingestão de oocistos em alimentos, solo ou água como os principais fatores de risco; 24% (6/25) estavam associados à ingestão de cistos teciduais de carne mal-cozida ou crua; e 4% (1/25) estavam associados a taquizoítos ingeridos através de leite não pasteurizado. As baixas condições socioeconômicas e educacionais no Brasil foram identificadas como importantes fatores de risco para infecções por *T. gondii* em humanos e foram associadas à

ingestão de oocistos em água não tratada, consumo de vegetais contaminados ou via contato com o solo (Shapiro *et al.*, 2019).

Na maioria dos adultos a doença é assintomática, mas pode causar cegueira e retardo mental em crianças com infecção congênita, que ocorre quando uma mulher se infecta durante a gravidez (Chavez-Ruvalcaba *et al.*, 2021). As infecções durante o primeiro trimestre são mais graves do que as adquiridas no segundo e terceiro trimestres, onde no início há uma infecção generalizada no feto, podendo atingir o sistema nervoso central, gerando sequelas (Wang *et al.*, 2017).

A doença leve pode consistir em visão levemente prejudicada, enquanto as crianças gravemente doentes podem ter a tétrede completa de sinais: coroidite de retina, hidrocefalia, convulsões e calcificação intracerebral, sendo a sequela mais comum da toxoplasmose congênita as doenças oculares (Wang *et al.*, 2017). A toxoplasmose pode ser uma doença devastadora em indivíduos imunossuprimidos, em que a encefalite é a manifestação mais perigosa da doença, podendo levar os indivíduos infectados a óbito (Chavez-Ruvalcaba *et al.*, 2021).

Para prevenção da infecção de seres humanos por *T. gondii*, devem ser tomadas precauções, como: ferver a água superficial antes de beber, adquirir uma boa higiene geral (lavagem frequente das mãos ou uso de luvas quando em contato com solo ou fezes de felinos, lavagem adequada de vegetais antes de serem consumidos, pois podem ter sido contaminados com fezes de gatos na água de irrigação ou no solo e evitar o consumo de carne crua ou mal-cozida (Hill e Dubey, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Padronizar uma metodologia de detecção de ovos de helmintos em formulações enterais preparadas com frutos e hortaliças frescas, visando sua aplicabilidade para aferição da sanidade parasitológica do alimento administrado a pacientes com necessidades alimentares especiais.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar se as formulações preparadas com alimentos crus oriundas de residências de pacientes apresentam contaminação natural por ovos de helmintos, mediante emprego da metodologia previamente padronizada.
- Verificar se as amostras preparadas com alimentos crus, apresentam contaminação natural por *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., e *Toxoplasma gondii*.
- Detectar e quantificar a concentração de indicadores microbiológicos nas amostras de formulações enterais domiciliares.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo e aspectos éticos

Este estudo é uma pesquisa do tipo observacional, experimental, transversal, com abordagem quantitativa, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná (UFPR), conforme o número CAAE: 13012119.0.0000.0102.

O estudo foi realizado em Curitiba, Pinhais e Piraquara-PR, no período de 01/08/2022 a 03/05/2024, e dividido em duas etapas: 1) padronização de metodologia para análise parasitológica; 2) coleta de amostras em domicílios de pacientes para análise microbiológica e parasitológica.

4.2 Etapa 1: padronização de metodologia para análise parasitológica de amostras de preparações enterais com alimentos (PEA)

Foi realizada a padronização de uma metodologia através de experimentos de contaminação artificial de preparação enteral com alimentos crus, visando à detecção de ovos de helmintos.

4.2.1 Preparo da formulação enteral

Para os experimentos de contaminação artificial das formulações enterais manipuladas, foram produzidas duas receitas adaptadas do livro de receitas “Nutrição enteral com alimentos”, desenvolvido na Universidade Federal do Paraná (UFPR) (De Oliveira *et al.*, 2022).

Receitas do livro incluem couve, morango, suco de laranja, e como os manipuladores/ cuidadores dos pacientes em atenção domiciliar podem adicionar outros vegetais e/ou frutas à preparação, foi incluído em ambas as receitas, vegetais folhosos e/ou frutas, para reproduzir essa situação, bem como, para tornar a amostra a ser contaminada artificialmente mais desafiadora.

As preparações compuseram os seguintes ingredientes:

- Preparação 1: 2 folhas de couve, 4 laranjas, 2 folhas de alface, 2 ramos de agrião, 2 colheres de sopa de açúcar e 400mL de água filtrada.
- Preparação 2: 8 morangos médios e 400mL de água filtrada.

Os ingredientes foram previamente higienizados em água corrente, e posteriormente triturados em liquidificador. Ambas as preparações foram peneiradas em uma peneira de malha fina, sendo 200mL acondicionados em sacos plásticos de primeiro uso, totalizando 4 sacos plásticos. Os sacos foram fechados e mantidos refrigerados (abaixo de 4°C) até a utilização para os ensaios de contaminação artificial.

4.2.2 Obtenção e preparo dos inóculos contendo ovos de *Ascaris suum*

Para os ensaios de contaminação artificial das preparações enterais com alimentos, foi utilizado ovos de *A. suum*.

Baseando-se no protocolo de Pineda *et al.* (2021), foram removidos fragmentos do útero da fêmea de *A. suum*, do terço final da bifurcação do útero, onde se encontram a maioria dos ovos férteis. A suspensão de ovos (solução estoque) foi lavada e homogeneizada em placa de Petri com a solução surfactante Tween 80 a 0,1%, para evitar a formação de grumos de ovos.

Em seguida, foram peneirados os fragmentos remanescentes, transferidos para dois tubos do tipo Falcon, sendo submetidos a centrifugação a 1250 x g por 5 minutos para concentração dos ovos. Após, os sobrenadantes foram removidos e os sedimentos acondicionados em dois microtubos distintos e armazenados em refrigeração até sua utilização.

Para determinar a concentração média de ovos presentes nas suspensões purificadas, foram realizadas duas contagens de 10 alíquotas de 10 μ L da solução dos inóculos, visualizados em microscópico óptico (Pineda *et al.*, 2021). A média resultante da enumeração de ovos de *A. suum* dos inóculos foram: dose 1 = 207 ovos, e dose 2 = 76 ovos, os quais foram utilizados em todos os ensaios de contaminação artificial para estimativa da eficiência de recuperação de ovos de cada protocolo.

4.2.3 Protocolos empregados para determinar a eficiência de recuperação de ovos de helmintos em amostras de PEA

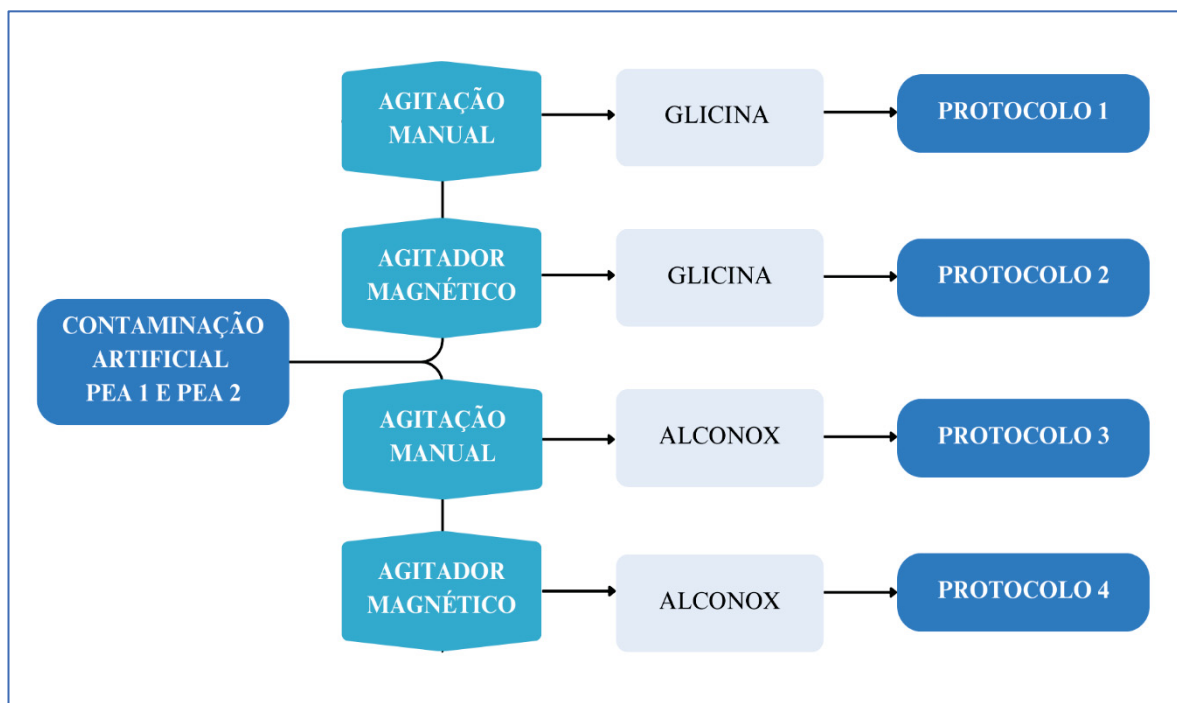
O número conhecido de ovos de *A. suum* (dose 1 e 2) foi inoculado nas amostras de PEA. Para a padronização do método proposto, 4 protocolos foram analisados em triplicata (48 ensaios de contaminação artificial no total).

Os protocolos empregados contaram com as seguintes variáveis (Fluxograma 1) para comparação da eficiência de recuperação:

- 1) **Solução de dissociação** – uso de Glicina 1M pH 5,5 ou Alconox 0,1%
- 2) **Homogeneização** – mediante agitação manual ou agitador magnético

Todos os protocolos tiveram como etapa em comum o tempo de sedimentação – 2h e a leitura de todo o sedimento.

Fluxograma 1: Variáveis empregadas para padronização do protocolo de detecção de ovos de helmintos em PEA, em amostras contendo hortaliças ou frutos frescos, contaminadas artificialmente com duas doses de ovos.



4.2.3.1 Processamento das amostras contaminadas artificialmente

Testes iniciais foram realizados para verificar qual seria a melhor diluição da amostra. Foram testados 50mL de PEA em 150mL de Glicina 1M pH 5,5 ou Alconox 0,1 %, em proporção 1:3. Porém, a amostra ficou muito obscura, o que dificultaria a leitura. Então foi realizado um segundo teste, utilizando 25mL de PEA em 175mL de Glicina 1M pH 5,5 ou Alconox 0,1 % em proporção 1:7, o qual clarificou melhor a amostra.

Após padronizado a proporção 1:7, foram medidos 25mL da PEA em proveta e transferido para um saco plástico de primeiro uso (homogeneização manual) ou para um Becker (homogeneização por agitador magnético) e em seguida, adicionado 175mL de Glicina 1M pH 5,5 ou Alconox 0,1 %. Prontamente, foi adicionado 10µL do inóculo contendo a dose de ovos de *A. suum* em vários pontos das preparações enterais com alimentos.

Em seguida, foi feita a agitação de forma manual (saco plástico) por 3 minutos de forma leve e pendular, ou através do agitador magnético (Becker) por 10 minutos, sendo cada

amostra contaminada transferida para um cálice de sedimentação - limpo e previamente tratado com solução de eluição Tween 80 (0,1%).

Após a transferência, foram adicionados mais 50mL de ambas as soluções para lavagem dos materiais (saco plástico ou Becker), e o líquido resultante adicionado à cada cálice, sendo estes mantidos em repouso em temperatura ambiente por 2 horas.

Decorrido o tempo de sedimentação, o sobrenadante foi descartado e 25mL da amostra foi transferido para um tubo Falcon de 50mL, sendo este centrifugado 1250 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e todo o sedimento remanescente (5mL) de cada ensaio de contaminação artificial foi lido em microscópio óptico para enumeração dos ovos recuperados.

A definição do melhor protocolo foi obtida através do cálculo de média de cada triplicata baseado na maior taxa de eficiência de recuperação dos ovos obtida nas preparações 1 e 2 contaminadas artificialmente com as duas doses de inóculos.

Concomitantemente aos ensaios, foram processadas uma amostra sem contaminação artificial (controle negativo / branco) de cada preparação enteral com alimentos para confirmar a presença ou ausência de ovos de *Ascaris* sp., para cada PEA em situação natural de contaminação.

4.2.4 Ensaio de aferição para análise da viabilidade dos ovos detectados em situação natural de contaminação.

Para inferir a viabilidade dos ovos de helmintos, foi realizado o teste de inclusão / exclusão do corante vital azul de Trypan (*Trypan Blue*), conforme descrito por Victoria e Galvan (2003). A verificação foi realizada em cada amostra de PEA ou amostra recebida de domicílios em que ovos de helmintos foram identificados. Em alíquota de 50µL de amostra, foi adicionado junto a lâmina uma alíquota de 6µL de corante azul de Trypan (0,1%). A visualização foi feita entre 3 e 5 minutos após a confecção do preparo conforme Altman *et al.* (1993). A viabilidade dos ovos era confirmada quando a solução não se incorporava ao mesmo.

4.3 Etapa 2: avaliação da qualidade microbiológica e parasitológica de formulações enterais oriundas de domicílios de pacientes

Foram coletadas em cada domicílio avaliado, uma amostra da formulação enteral manipulada e pronta para consumo. Todas as amostras foram utilizadas para identificação de bactérias, e somente as que continham alimentos crus adicionados ou sucos, foram analisadas quanto a contaminação por parasitos.

4.3.1 Amostragem do estudo

O estudo compõe formulações enterais manipuladas (preparações com alimentos, preparações mistas e fórmulas comerciais) no domicílio de pacientes, cadastrados no Programa de Atenção Nutricional às Pessoas com Necessidades Especiais de Alimentação (PAN), da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba, Pinhais e Piraquara-PR.

Para definir o número de formulações enterais a serem coletadas, foi realizado um levantamento do total de registros de pacientes atendidos em 2022, sendo 515 participantes do PAN no município de Curitiba, Pinhais e Piraquara-PR.

Todos os domicílios de pacientes vinculados ao PAN que utilizavam formulações enterais manipuladas no domicílio, foram convidados verbalmente ou por telefone pela Nutricionista da Unidade de saúde a participar da pesquisa. Aqueles que demonstraram interesse em participar e assinaram o TCLE, fizeram parte do estudo.

Os critérios de inclusão foram: domicílio de pacientes vinculados ao PAN, em uso de nutrição enteral com sonda, seja preparações com alimentos, preparações mistas e fórmulas comerciais em pó, e que concordaram em participar da pesquisa, por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

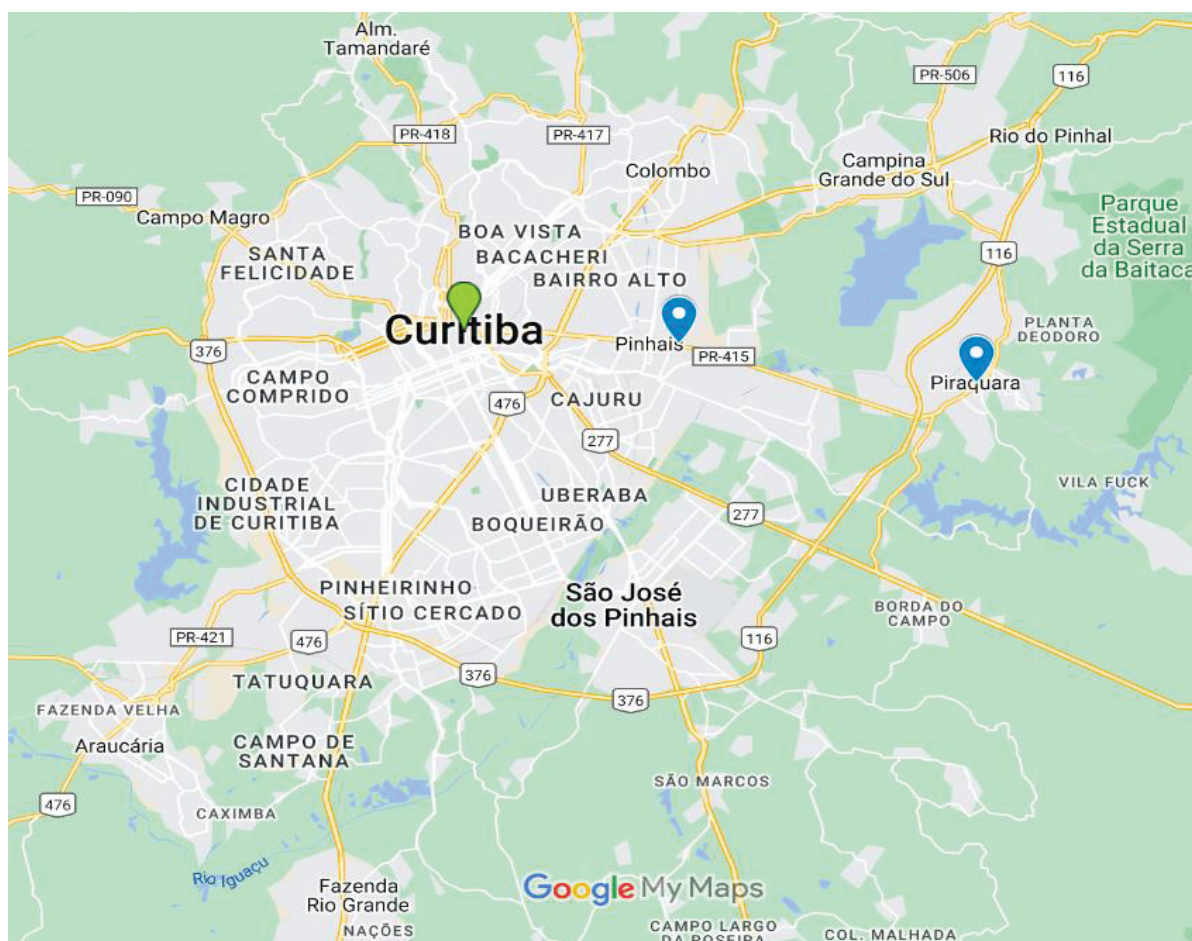
4.3.2 Coleta das amostras

Para a coleta das amostras, foi realizada uma visita no domicílio dos pacientes, previamente agendadas pelas nutricionistas responsáveis pelas Unidades de Saúde da região de Curitiba, Pinhais e Piraquara-PR (Figura 1). A Nutricionista acompanhou as etapas de coleta, juntamente com o agente comunitário da unidade de saúde. Com o auxílio de um

frasco plástico esterilizado identificado, foi coletado, em cada domicílio, um total de 150mL da formulação enteral manipulada pronta para consumo, do qual, é consumida 200mL a 300mL por hora, pelo paciente (Vieira, Lima e Cruz, 2021). Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em caixa de isopor isotérmica e transportadas para o laboratório de higiene de alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná, sendo mantidas refrigeradas (abaixo de 4°C) por no máximo 2 horas até a análise microbiológica.

Após retirada de parte do material para as análises microbiológicas, as amostras foram recondicionadas em caixa de isopor isotérmica e transportada para o laboratório de Parasitologia Ambiental, do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, para realização da análise parasitológica, em até 24 horas.

Figura 1: Regiões destacadas onde foram realizadas as coletas das amostras – Curitiba, Pinhais e Piraquara – PR.

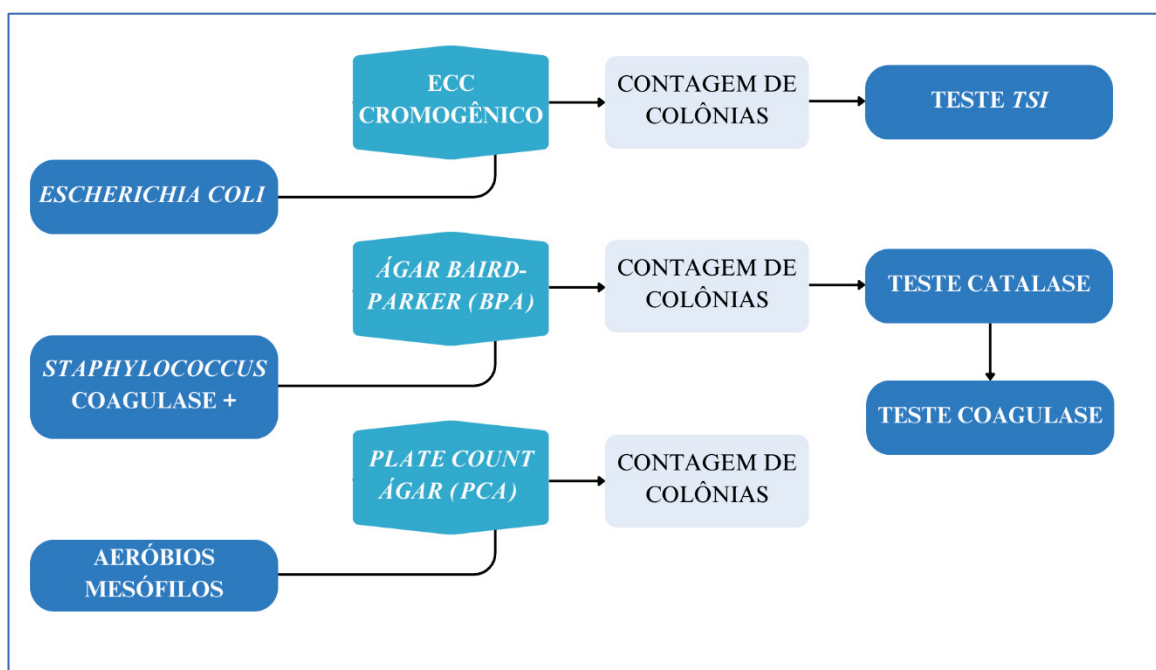


Fonte: Google Maps, 2024.

4.3.3 Análise microbiológica

Para cada amostra analisada, foram pesquisados os microrganismos indicadores *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase-positiva e aeróbios mesófilos, conforme demonstrado no fluxograma 2:

Fluxograma 2: Protocolo empregado para identificação e enumeração dos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e aeróbios mesófilos.



4.3.3.1 Identificação e contagem de microrganismos indicadores

Para cada análise microbiológica, foi utilizada duas diluições decimais: 10^{-1} e 10^{-2} . Para a diluição 10^{-1} , uma alíquota de 1mL da amostra foi adicionada em 9mL de Água Peptonada 0,1%, e para obtenção da diluição 10^{-2} , uma alíquota de 1mL da diluição 10^{-1} foi adicionada em 9mL de Água Peptonada.

As análises foram realizadas em triplicata, através do método de plaqueamento por superfície em *Plate Count Agar* (PCA) (*Cralplast*[®]) para aeróbios mesófilos, ECC cromogênico (*Laborclin*[®]) para *E. coli* e (*Ágar Baird-Parker*) (BPA) (*Laborclin*[®]) para *Staphylococcus*. Alíquotas de 0,1mL de amostra pura e diluições 10^{-1} e 10^{-2} , foram estriadas

nas placas de ágar e incubadas em posição invertida em uma estufa bacteriológica a 36°C durante 48 horas.

As análises microbiológicas foram realizadas conforme descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (2015).

Os resultados foram comparados com a RDC nº 503, de 27 de maio de 2021, a qual determina valores de corte para contaminação por microrganismos em nutrição enteral (Brasil, 2021).

4.3.3.2 Testes confirmatórios

Foram realizados testes confirmatórios para *E. coli* e *Staphylococcus*. Para *E. coli* foi feito o teste TSI (*Triple Sugar Iron Agar*) (*Laborclin*®): com uma alça de drigalski descartável, uma colônia característica de cada amostra foi retirada, inoculada na rampa de ágar TSI e incubado em estufa bacteriológica a 36°C por 24 horas. Havendo mudança da cor original do ágar de alaranjado para amarelo, era confirmado a presença de *E. coli*.

Já para a confirmação de *Staphylococcus* coagulase-positiva foi feito inicialmente o teste de catalase: uma gota de solução de Peróxido de Hidrogênio (água oxigenada) era adicionada em um pedaço de cartolina, e com o auxílio de uma alça de drigalski descartável, coletado o centro de uma colônia suspeita, realizado o movimento de esfregação e observado se havia formação de bolhas.

Após a confirmação do teste da catalase, foi realizado o teste de coagulase em seguida. Com o auxílio da alça de drigalski, foi coletado uma colônia característica, transferida para dentro de um tubo contendo Plasma Coagulase EDTA (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) (*Laborclin*®), e observado a formação de coágulo. Se havia a presença de coágulos grandes, era confirmado a presença de *Staphylococcus* coagulase-positiva.

4.3.4 Análise parasitológica

4.3.4.1 Pesquisa de ovos e helmintos

Para a identificação de helmintos em preparações enterais oriundas de domicílios de pacientes que continham alimentos crus foi escolhido o protocolo que obteve a maior taxa de recuperação de ovos através dos ensaios de contaminação artificial. Para amostras que

envolviam vegetais folhosos foi aplicado o protocolo que obteve a maior eficiência de recuperação na preparação 1. E para amostras que continham frutos, especialmente silvestres, foi escolhido o protocolo que alcançou maior taxa de recuperação na preparação 2.

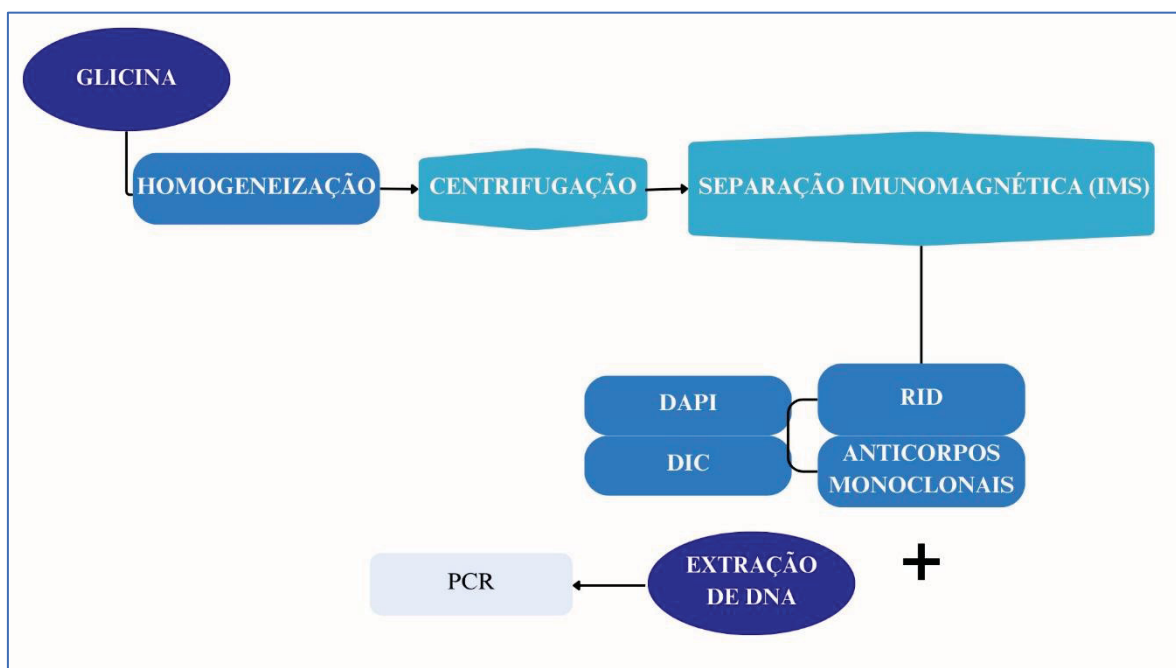
4.3.4.2 Pesquisa de protozoários patogênicos

Para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. Foram utilizados os preceitos da ISO n° 18744, de concentração, eluição, purificação e visualização da amostra de acordo com as seguintes etapas (Fluxograma 3):

- 1) **Solução de dissociação** - Glicina 1M pH 5,5
- 2) **Homogeneização** - agitador magnético
- 3) **Pesquisa de cistos e oocistos:** Separação Imunomagnética (IMS) e Reação de Imunofluorescência Direta (RID) com anticorpos monoclonais: anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*.

Adicionalmente, parte do produto purificado na etapa de IMS foi utilizado para realização de análises moleculares: extração de DNA, seguido da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Fluxograma 3: Protocolo empregado para verificação da contaminação por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.



4.3.4.2.1 Diluição e centrifugação

As amostras de PEA foram previamente diluídas em um copo de Becker, em proporção inicialmente definida, ou seja, 25mL de amostra em 175mL de Glicina 1M pH 5,5 em proporção 1:7, totalizando 200mL. Em seguida, foi feita a homogeneização através do agitador magnético por 10 minutos.

Com o auxílio de 4 tubos Falcon, foram transferidos 50mL da diluição para cada tubo. Em seguida, foram adicionados mais 50mL de Glicina 1M pH 5,5 para lavagem do Becker utilizado para homogeneização, durante 3 minutos. Após, este líquido de lavagem foi transferido para um 5º tubo Falcon, totalizando 5 tubos contendo 50mL cada, sendo todos em seguida, concentrados por centrifugação a 1500 x g por 15 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os sedimentos transferidos para um só tubo Falcon. Com água destilada, o tubo foi completado e em seguida centrifugado novamente a 1500 x g por 15 minutos. Após retirado o sobrenadante, uma alíquota de 500µL foi transferido para microtubos de 1,5mL e mantidos sob refrigeração até a realização da IMS.

4.3.4.2.2 Separação Imunomagnética (IMS)

A etapa de concentração e recuperação de cistos e oocistos foi realizada através da técnica padrão de separação imunomagnética – IMS (Waterborne, INC[®]). Em um tubo de lado plano (Leighton), foram adicionados 0,5mL da amostra primeiramente concentrada. Em seguida, o microtubo que continha a amostra foi lavado duas vezes com 1mL de Grab[™] Buffer-A, e adicionado ao tubo plano contendo a amostra. Após, a este mesmo tubo plano, foi adicionado mais 3mL do tampão Grab[™] Buffer-A, completado com água destilada, totalizando 10mL, e misturado por inversão 3 vezes.

Em seguida, os frascos contendo *Dynabeads* anti-*Crypto* e anti-*Giardia* foram agitados em vórtex por aproximadamente 10 segundos para suspensão das partículas, e após, adicionados 100µL dos *Dynabeads*[®] de anti-*Crypto* e 100µL de anti-*Giardia* ao tubo contendo o concentrado da amostra e o tampão. Então, o tubo foi fixado em um mixer rotatório (DynaL Biotech), e rotacionado por cerca de 20 rpm durante 1 hora à temperatura ambiente. Decorrido o tempo, o tubo foi removido do mixer rotatório e posicionado em um ímã (MPC1), sendo balançado manualmente (extremidade a extremidade, em um ângulo de cerca de 90°, inclinando a extremidade da tampa do tubo e a extremidade do fundo do tubo para cima e para baixo, uma de cada vez) de forma continuada durante 3 minutos, com cerca de uma inclinação por segundo. Posteriormente, com o tubo em posição vertical o sobrenadante foi destinado para pesquisa de *T. gondii* e ao sedimento adicionado 450µl de Grab[™] Buffer-B.

Utilizando uma pipeta Pasteur, foi transferido o volume de 450µL da suspensão para um microtubo de 1,5mL, enxaguado o tubo de lado plano duas vezes com 450µL de Grab[™] Buffer-B e adicionado esses enxágues ao mesmo microtubo de 1,5mL. Em seguida, o microtubo foi colocado no ímã pequeno (MPC-S) e balançado de ponta a ponta, em aproximadamente 180°, durante 1 minuto.

Após, com o tubo preso ao ímã, foi aspirado e descartado o sobrenadante com uma pipeta Pasteur. Em seguida, o tubo foi removido do pequeno ímã e adicionando 50µl de água destilada ao microtubo e vortexado durante 10 segundos. Então, a amostra foi colocada em banho maria a 80°C durante 10 minutos, e após, vortexado durante 10 segundos. Após

verificado que toda a amostra estava na base do tubo, este foi recolocado no MPC-S, seguido da fita magnética e aguardado 10 segundos. Em seguida, todo o líquido do tubo foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga, sem que fossem agitados as micro pérolas na parede do tubo.

Foram realizadas três dissociações térmicas a 80°C e a partir do produto purificado, 50µl foram depositados no poço da lâmina de imunofluorescência para realização da RID, e o produto restante (100µl) utilizado para extração de DNA.

4.3.4.2.3. Visualização dos protozoários por RID

Os protozoários foram identificados por reação de imunofluorescência direta, mediante marcação com anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*, conjugados com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (Merifluor®). Aliquotas de 50µl de cada amostra foram transferidas para o poço da lâmina e aguardado a secagem em temperatura ambiente, usualmente, durante 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 50 microlitros de metanol absoluto ao poço da lâmina contendo a amostra, e aguardado a secagem por 10 minutos. Então, foi adicionado uma gota do Reagente/Fluido de Detecção (anticorpo monoclonal anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*), e uma gota do contra corante, assegurando-se que os dois componentes se misturassem. Após, a lâmina foi colocada em uma câmara úmida, ao abrigo da luz por 30 minutos.

Em seguida, a lâmina foi removida da câmara úmida, e utilizando uma pipeta Pasteur limpa, o poço da lâmina foi lavado delicadamente com solução tampão, retirando o excesso de anticorpos. Posteriormente, foram aplicados 50 microlitros da solução de DAPI (1/5000, em PBS) e deixado em temperatura ambiente ao abrigo da luz por minutos.

O excesso de DAPI foi removido e adicionado 50 microlitros de tampão de lavagem do kit (Merifluor®). Após, as lâminas foram colocadas em dessecador (sílica) e protegido da luz durante 1 hora, à temperatura ambiente. Por fim, cada lâmina recebeu o meio de montagem do kit, sendo recobertas com uma lamínula e armazenadas no escuro, em geladeira até a etapa de leitura em microscópio de imunofluorescência.

A morfologia dos protozoários foi confirmada pela incorporação do corante vital DAPI ao material nuclear dos protozoários e, simultaneamente por DIC (Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial). Os critérios de positividade adotados foram os preconizados pelo método 1623.1 da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2012).

4.3.4.2.4. Detecção de protozoários patogênicos por técnicas moleculares

Extração de DNA

As extrações de DNA das amostras contendo alimentos crus foram realizadas com o kit ZymoBiomics DNA Miniprep® - USA, segundo o protocolo proposto pelo fabricante, a partir de uma alíquota de 100µL resultante da IMS.

Reações de PCR

As análises moleculares foram realizadas em parceiras com Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

As reações de PCR foram realizadas utilizando um kit comercial (GoTaq®Green Master Mix - Promega). Cada 12,5µL do “mix” continha 1 unidade de Taq DNA polimerase em 10mM Tris-HCl, pH 8.5; 50 mM KCl; 1.5mM MgCl₂ e 200mM de cada um dos deoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Cada reação foi realizada adicionando-se 5µL do DNA alvo e 10pmol de cada iniciador, em um volume final de 25µL. As amplificações foram realizadas utilizando o termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®).

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em um sistema eletroforético horizontal em gel de agarose a 1,2% tampão TBE 1x (45mM de Tris-Borato e 1mM de-EDTA, pH 8.0), contendo brometo de etídio a 0,5g/mL. Em todos os géis foram adicionados o marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100pb e as corridas foram realizadas a 100 Volts por 1h (fonte PS 1006, Apelex, França). As amostras foram

visualizadas e fotografadas em um transiluminador Gene Genius (Programa Gel Capture Pro, versão 4.5.3) de ultravioleta a um comprimento de onda de 30 nm.

Os iniciadores (*Primers*) específicos utilizados para a detecção de *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., e *T. gondii* estão descritos na tabela 3.

Em todas as reações foram utilizados controles positivos dos protozoários, e como controle negativo foi utilizada água ultrapura. Todas as amostras de DNA extraídas tiveram suas concentrações mensuradas em espectrofotômetro de micro volumes (Nanodrop Thermo Fisher Scientific®) e foram utilizadas para as reações de PCR.

Tabela 3: Descrição dos iniciadores moleculares utilizados neste estudo.

Protozoário	Iniciadores moleculares (Sequência 5' - 3')	Sonda
<i>Cryptosporidium</i> spp.	CryIAL1(F) AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC CryIAL2(F) - AAGTGCGTCAACGAGCAGCT CryIAL3(R) -GTCGTCTCGAAGATCCAGGGCGGCCTC	Não se aplica
<i>Giardia</i> spp.	GG(F) – AAGTGCGTCAACGAGCAGCT G7(F) – AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC G759(R) - GTCGTCTCGAAGATCCAGGGCGGCCTC	Não se aplica
<i>Toxoplasma gondii</i>	REP 529 – AGAGACACCGGAATGCGATCT TTCGTCCAAGCCTCCGACT	FAM: TCGTGGTGATGGCGGAGA GAATTGA

PCR para *Cryptosporidium* spp.

A detecção de *Cryptosporidium* spp. por PCR foi realizada conforme protocolo padronizado por Marciano *et al.* (2022) (Tabela 4), utilizando-se iniciadores moleculares denominados CryIAL1(F) / CryIAL2(F) / CryIAL3(R), que amplificam um fragmento do mesmo gene da parede de oocisto de *Cryptosporidium* spp., gerando dois produtos de 703 e 531pb, reação que foi denominada de semi-nested em tubo único. Foram utilizados 0,1µL, 0,5µL e 0,5µL dos iniciadores moleculares CryIAL1(F), CryIAL2(F) e CryIAL3(R), respectivamente.

As amplificações foram realizadas conforme descrito abaixo. Foi adicionada uma etapa inicial composta de 20 ciclos para que ocorresse o anelamento dos iniciadores CryIAL1(F) e CryIAL3(R) em temperatura de 61 °C, após esta etapa, seguiu-se um intervalo de 4°C por 2 min., e foram adicionados 35 ciclos a 56°C para anelamento dos iniciadores

CryIAL2(F) e CryIAL3(R).

Tabela 4: Programa de amplificação da semi-nested PCR em tubo único para *Cryptosporidium* spp.

1º Ciclo	94°C/5min	20X (94°C/30s; 61°C/30s; 72°C/30s)	72°C/2min	4°C/5min
2º Ciclo		35X (94°C/30s; 56°C/30s; 72°C/45s)	72°C/5min	4°C/∞

PCR para *Giardia* spp.

A PCR para determinação de *Giardia* spp. foi realizada utilizando-se iniciadores moleculares e a reação semi-nested em tubo único previamente descrita por Marciano *et al.* (2022) (Tabela 5).

Os iniciadores moleculares G7(F) (0,1µL), GG (F) (0,5 µL) e o G759(R) (0,5 µL), foram utilizados conforme descrito abaixo, em uma reação de 25µL. A amplificação foi realizada inicialmente com 20 ciclos dos iniciadores G7(F) e G759(R) com temperatura de 65 °C para anelamento. Seguiu-se um intervalo de 4°C por 2min e foram adicionados 35 ciclos a 58°C para anelamento dos iniciadores GG (F) (0,5 µL) e G759(R), gerando dois produtos de 754 e 149 pb

Tabela 5: Programa de amplificação da semi-nested PCR em tubo único para *Giardia* spp., com as respectivas temperaturas do 1º e 2º ciclos.

1º Ciclo	94°C/5min	20X (94°C/30s; 65°C/30s; 72°C/30s)	72°C/2min	4°C/5min
2º Ciclo		35X (94°C/30s; 58°C/30s; 72°C/45s)	72°C/5min	4°C/∞

Reação de PCR em tempo real (qPCR) para *T. gondii*

A detecção do DNA do protozoário foi feita mediante utilização do líquido de descarte da etapa de IMS (MPC1), sendo o volume de descarte (10ml), centrifugado a 1500 x g por 15 minutos. Alíquotas de 300µL do sedimento foram submetidas à extração de DNA, conforme descrito previamente. Em seguida, efetuou-se a reação de qPCR, utilizando-se o

par de iniciadores moleculares denominado REP-529, mostrados na tabela 3, que amplifica uma sequência de 112pb, altamente repetitiva de REP-529 (GenBank AF487550), conforme descrito por Belaz *et al.* (2015), no equipamento QuantiStudio 5 Real Time PCR System (Applied Biosystems) em volume final de 20 μ L por reação. A alíquota de 3 μ L do DNA extraído foi adicionada à mistura que continha 10 μ L de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e os marcadores moleculares (1,25 μ L do “Assay Mix” contendo 18 μ M de cada marcador molecular e 5 μ M da sonda).

As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50°C por 2 min, um ciclo a 95°C por 10 min., e em seguida foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 min.

4.4. Análise estatística

Inicialmente, os dados foram apresentados com o cálculo de medidas descritivas (média, desvio padrão e porcentagens). Em seguida, foi verificado o pressuposto de normalidade dos dados através do teste de Shapiro Wilk. Comprovada a falta de normalidade das variáveis do estudo, optou-se por testes de significância não paramétricos.

Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para comparação dos protocolos realizados na padronização da metodologia para detecção de ovos de helmintos em preparações enterais com alimentos. Foram realizadas duas comparações, uma frente a dose e protocolo utilizado, e outra para média e percentual de ovos recuperados, para identificar se houve diferença estatística significativa foram considerados valores de $p < 0,05$.

O teste Qui-quadrado foi aplicado para comparação dos tipos de formulações enterais analisadas frente aos limites recomendados pela RDC nº 503/2021 (Brasil, 2021) para microrganismos, sendo considerado os valores de $p < 0,05$.

Para as análises descritas acima foi empregado o software Statistica Statsoft versão 7®.

5. RESULTADOS

5.1 Padronização de metodologia para detecção de ovos de helmintos em preparações enterais com alimentos (PEA)

As médias das taxas de eficiência de recuperação de ovos entre os 4 protocolos analisados e as duas doses utilizadas, correspondentes a 48 ensaios, variaram entre 47,36% e 66,02% na preparação 1 (Tabela 6), e entre 39,80% e 65,17% na preparação 2 (Tabela 7).

Dentre todos os ensaios realizados com a PEA 1, o protocolo que obteve maior taxa de recuperação, foi o de número 2 – Glicina (1M, pH 5,5) e agitador magnético.

Para a dose 1 a eficiência média de recuperação foi de 66,02%, e para a dose 2 de 55,26% (Tabela 6). Portanto este método foi o eleito para análise de preparações enterais contendo vegetais de folhas verdes.

Já para a PEA 2, o protocolo que obteve a maior taxa de recuperação, foi o de número 4 – Alconox[®] e agitador magnético, o qual para a dose 1 a eficiência média de recuperação de ovos de helmintos foi de 65,17%, e para a dose 2 de 52,19% (Tabela 7).

Tabela 6: Avaliação da sensibilidade de detecção de ovos de helmintos em preparação enteral com alimentos contaminada artificialmente com ovos de helmintos mediante aplicação de diferentes protocolos de homogeneização e soluções de dispersão utilizando a preparação 1 (PEA 1).

Nº Protocolo	Nº ovos recuperados – ensaio 1 (%)	Nº ovos recuperados – ensaio 2 (%)	Nº ovos recuperados – ensaio 3 (%)	Média final de ovos recuperados (%)	Desvio padrão ensaios	p ¹	p ²
Dose 1 – 207 ovos							
1	157 (75,84)	129 (62,32)	117 (56,52)	134,33 (64,89)	20,53		
2	134 (64,73)	164 (79,23)	112 (54,1)	136,67 (66,02)	26,10	0,01	0,110
3	109 (52,65)	106 (51,2)	104 (51,74)	106,33 (51,37)	2,52		
4	148 (71,49)	117 (56,52)	109 (52,6)	124,67 (60,22)	20,60		
Dose 2 – 76 ovos							
1	38 (50%)	48 (63,15%)	32 (42,1%)	39,33 (51,75%)	8,08		
2	39 (51,31%)	42 (55,26%)	45 (59,21%)	42,00 (55,26%)	3,00	0,74	0,204
3	39 (51,31%)	44 (57,89%)	41 (53,94%)	41,33 (54,38%)	2,52		
4	38 (50%)	36 (47,36%)	34 (44,73%)	36,00 (47,36%)	2,00		

* **Legenda:** 1 = Agitação manual com glicina; 2 = Agitador magnético com glicina; 3 = Agitação manual com Alconox®; 4 = Agitador magnético com Alconox®; p¹ = análise Kruskal-Wallis para dose e protocolo utilizado; p² = análise Kruskal-Wallis para a média e % de ovos recuperados.

Tabela 7: Avaliação da sensibilidade de detecção de ovos de helmintos em preparação enteral com alimentos contaminada artificialmente com ovos de helmintos mediante aplicação de diferentes protocolos de homogeneização e soluções de dispersão utilizando a preparação 2 (PEA 2).

Nº Protocolo	Nº ovos recuperados – ensaio 1 (%)		Nº ovos recuperados – ensaio 2 (%)		Nº ovos recuperados – ensaio 3 (%)		Média final de ovos recuperados (%)	Desvio padrão ensaios	p ¹	p ²
	Dose 1 – 207 ovos									
1	124 (59,9)	103 (49,7)	107 (51,69)	111,33 (53,76)	11,15					
2	114 (55,07)	87 (42,02)	119 (57,4)	106,67 (51,50)	17,21			0,00001		0,103
3	92 (44,4)	77 (37)	80 (38)	83,00 (39,80)	7,94					
4	135 (62,2)	99 (47,8)	177 (85,5)	137,00 (65,17)	39,04					
Dose 2 – 76 ovos										
1	40 (52,63%)	41 (53,94%)	32 (42,1%)	37,67 (49,56%)	4,93					
2	32 (42,1%)	40 (52,63%)	28 (36,84%)	33,33 (43,86%)	6,11			0,70		0,502
3	28 (36,84%)	34 (44,73%)	39 (51,31%)	33,67 (44,29%)	5,51					
4	38 (50%)	47 (61,84%)	34 (44,73%)	39,67 (52,19%)	6,66					

* **Legenda:** 1 = Agitação manual com glicina; 2 = Agitador magnético com glicina; 3 = Agitação manual com Alconox[®]; 4 = Agitador magnético com Alconox[®]; p¹ = análise Kruskal-Wallis para dose e protocolo utilizado; p² = análise Kruskal-Wallis para a média e % de ovos recuperados.

A utilização de solução de dissociação a base de aminoácido Glicina (1M, pH 5,5) (protocolo 2) se mostrou mais eficaz na recuperação de ovos de *A. suum* na PEA 1, e em ambas as doses, mesmo contendo vários ingredientes na preparação – alface, couve, laranja e agrião, o que deixava a amostra mais obscura para visualização (Figura 2A). Porém, a solução Alconox[®] (protocolos 3 e 4), clarificou melhor a PEA 1 comparado à Glicina (1M, pH 5,5) (Figura 2B).



Figura 2A: ovo de *A. suum* (marcado com a seta em vermelho), visualizado em 40x na PEA 1, utilizando Glicina (1M, pH 5,5).



Figura 2B: ovo de *A. suum* (marcado com a seta em vermelho), visualizado em 40x na PEA 1, utilizando Alconox®.

Logo, a solução de Alconox® e agitador magnético (protocolo 4), foi mais eficaz na recuperação de ovos de *A. suum* na PEA 2, em ambas as doses (Figura 3A e 3B). Entretanto, as médias resultantes do protocolo 1 na dose 2, utilizando Glicina (1M, pH 5,5) foi próxima ao resultado obtido pelo protocolo que apresentou maior eficiência de recuperação (Tabela 7).

Quanto ao método de homogeneização, os protocolos que apresentaram maior taxa de recuperação para ambas as doses e PEA, foram aqueles submetidos ao agitador magnético (Tabelas 6 e 7).

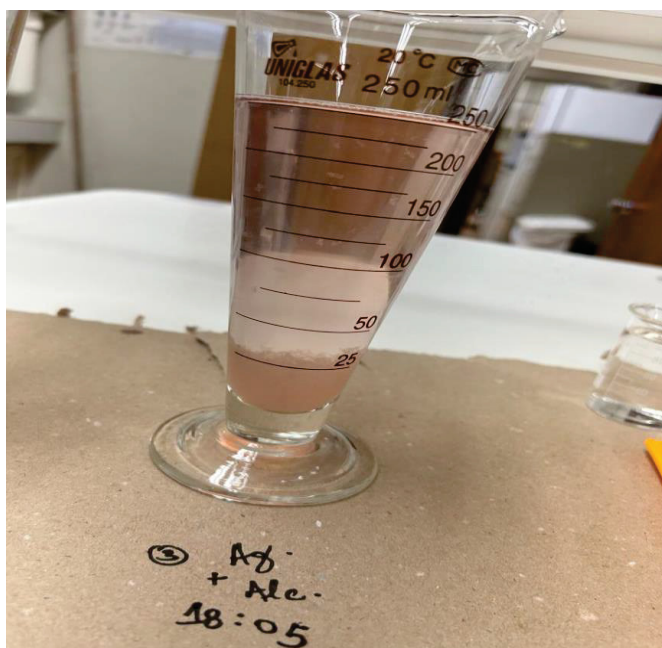


Figura 3A: processo de sedimentação da PEA 2, utilizando o protocolo 4.



Figura 3B: ovos de *A. suum* (marcado com a seta em vermelho), visualizados em 40x na PEA 2, utilizando Alconox®.

Considerando as doses utilizadas (dose 1 = 207 ovos; dose 2 = 76 ovos) para cada protocolo, foi observado diferença significativa para a dose 1, tanto para a PEA 1 ($p = 0,01$), quanto para a PEA 2 ($p = 0,00001$). Além disso, o protocolo de número 3 teve a menor contagem de ovos na PEA 1 e 2 utilizando a dose 1.

Para a dose 2, não houve diferença estatística entre os protocolos utilizados na PEA 1 ($p = 0,74$) e PEA 2 ($p = 0,70$).

Logo, quando comparado as duas doses utilizadas frente a média e % de ovos recuperados, ou seja, a eficiência de recuperação, não houve diferença estatística entre os protocolos utilizados na PEA 1 (dose 1: $p = 0,110$; dose 2: $p = 0,204$) e PEA 2 (dose 1: $p = 0,103$; dose 2: $p = 0,502$).

5.2 Contaminação natural por parasitos durante os ensaios de PEA e em amostras de formulações com alimentos crus oriundas da casa de pacientes em uso de NE.

Durante a padronização da metodologia para detecção de ovos de helmintos na PEA 1 composta de alface, couve, laranja e agrião, foi encontrado contaminação por ovo de

Toxocara sp., (Figura 4A) e a presença de ácaro em sua composição (Figura 4B). A PEA 2 – morango e água, apresentou contaminação por ovo de ancilostomatídeo (Figura 5A), bem como artrópodes foram visualizados frequentemente (Figura 5B). O teste de viabilidade utilizando o corante *Trypan blue* revelou que os ovos se encontravam viáveis, visto que não incorporaram a solução (Figura 4A).

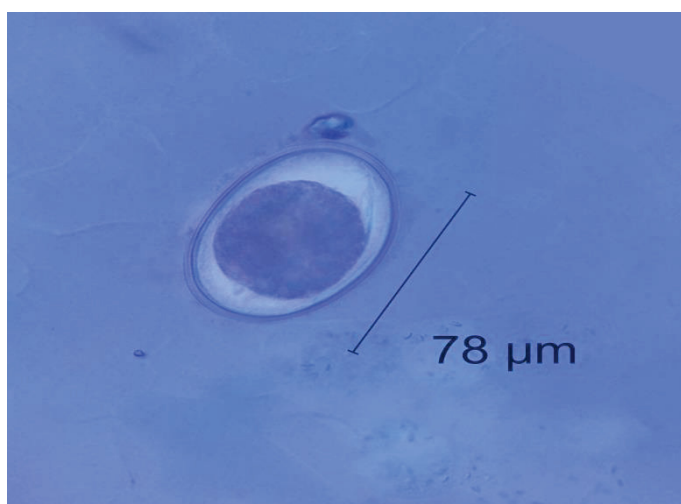


Figura 4A: Ovo viável de *Toxocara* sp., corado com *Trypan Blue*, visualizado em 40x.



Figura 4B: Ácaro visualizado em 40x.

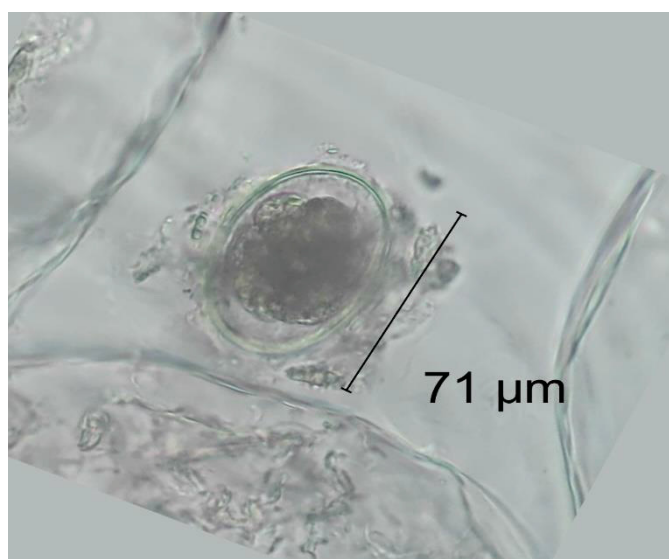


Figura 5A: Ovo de ancilostomatídeo contendo blastômeros visualizado em 40x.



Figura 5B: Artrópode visualizado em 40x.

Duas amostras de formulação enteral contendo alimentos crus oriundas de domicílios foram analisadas quanto a contaminação natural por ovos de helmintos. Para a amostra 7, foi utilizado o protocolo 2, pois incluía um vegetal folhoso em sua composição (ora-pro-nóbis), e para a amostra 39, foi utilizado o protocolo 4, pois continha uva e morango.

Não foram encontrados ovos ou larvas de helmintos em nenhuma das amostras, porém, na amostra 39, foi encontrado um artrópode (Figura 6), o que caracteriza a amostra imprópria para consumo comparado ao padrão RDC nº 623/2022 (Tabela 8).

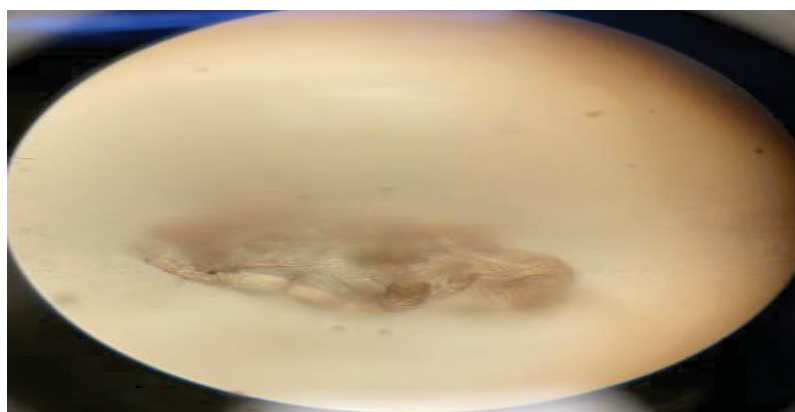


Figura 6: Artrópode visualizado em 40x em amostra de formulação enteral contendo morango.

Tabela 8: Critérios utilizados para avaliação da qualidade parasitológica em formulações enterais preparadas com alimentos crus de acordo com as preconizações de legislação no Brasil.

Amostra	Protocolo	Ovos/ larvas de helmintos	Cisto/ocistos de protozoários	Artrópodes/ fragmentos	Próprio /impróprio
Padrão RDC nº 623/2022		Ausência	Ausência	Ausência	-
Resultados					
7	2	Ausência	Ausência	Ausência	P
39	4	Ausência	Presença	Presença	I

Ambas as amostras (7 e 39), foram processadas para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., conforme descrito anteriormente, mediante IMS e RID. Cistos de *Giardia* spp. não foram identificados. *Cryptosporidium* spp., foi evidenciado na amostra 39 (tabela 8) detectado por RID (Figura 7).



Figura 7: Oocisto de *Cryptosporidium* spp., com sutura detectado por RID em amostra de preparação enteral contendo morango.

Para as duas amostras, foi realizada a extração de DNA, seguido da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção de material genético dos protozoários patogênicos.

Não foi observado amplificação de DNA para os protozoários *Cryptosporidium* spp., *T. gondii.*, e *Giardia* spp.

5.3 Qualidade microbiológica de formulações enterais manipuladas em domicílio

Foram coletadas 68 amostras enterais, das quais incluíram fórmulas enterais comerciais, preparações enterais com alimentos e preparações enterais mistas. A composição de cada uma delas encontra-se descrita na tabela 9.

Tabela 9: Composição das formulações enterais analisadas quanto a contaminação por microrganismos e/ou parasitos.

Amostra	Composição	Análise	
		Microbiológica	Parasitológica
1	Goiaba sem casca e água mineral	S	N
2	Ovo cozido, farinha de arroz integral, farinha de aveia, leite integral em pó e psyllium	S	N
3	Leite, banana e Nutren®	S	N
4	Leite UHT + Trophic® 1.5	S	N
5	Batata cozida, Trophic Basic®, farinha de trigo torrada, óleo, sal e água da torneira	S	N
6	Leite UHT e Trophic Basic®	S	N
7	Arroz, feijão, batata cozida, chuchu cozido, cenoura cozida, beterraba cozida, ora-pro-nóbis cru e carne de frango cozida	S	S
8	Nhame, cenoura, chuchu, abobrinha, brócolis e carne moída (todos bem cozidos)	S	N
9	Fórmula em pó (Trophic®) e leite integral caixinha (Tirol®)	S	N
10	Carne, batata, cenoura, arroz, açúcar, óleo, Mussilon®, ovos e leite sem ferver	S	N
11	Ovo cozido, óleo, aveia, castanha e leite de caixinha integral	S	N
12	Trophic® pó mais água fervida	S	N
13	Trophic® pó mais água fervida	S	N
14	Fórmula comercial	S	N
15	Fórmula comercial em pó e leite	S	N
16	Fórmula comercial em pó e leite	S	N
17	Ameixa seca e água quente	S	N
18	Carne (músculo), batata salsa, abóbora madura e cabotiá e batata doce	S	N
19	Fórmula comercial em pó e água	S	N

20	Albumina em pó, maltodextrina em pó, batata cozida, sal, mucilagem de milho, farinha de arroz, farinha de aveia, óleo de soja e óleo de canola, castanha do Brasil, leite integral e leite desnatado, ambos de caixinha	S	N
21	Fórmula comercial em pó, água e óleo de soja	S	N
22	Fórmula comercial em pó, leite em pó, leite de caixinha, ovo em pó, amido de milho, azeite de oliva e açúcar	S	N
23	Fórmula pronta	S	N
24	Fórmula comercial em pó, água e Maltodextrina	S	N
25	Fórmula comercial em pó, água e óleo de soja	S	N
26	Fórmula comercial em pó e leite de caixinha	S	N
27	Fórmula comercial em pó e leite de caixinha	S	N
28	Fórmula comercial em pó e água	S	N
29	Fórmula comercial em pó e água	S	N
30	Leite UHT integral, Mussilon®, banana, mamão e bolacha	S	N
32	Urc med®, Aptamil®, Carbo CH® e óleo de coco	S	N
32	Trophic® pó mais água fervida	S	N
33	Arroz, carne moída, cenoura, batata, açúcar, leite em pó, leite integral, óleo de soja, sal, Mussilon®, arroz e ovo	S	N
34	Trophic® pó mais água fervida	S	N
35	Batata, cenoura, abobrinha, batata salsa, abóbora menina, ovo cozido e Trophic Basic®	S	N
36	Abacate, água, Neo Advance® e Colagen®	S	N
37	Trophic® pó, nutrem 1,0® pó e água	S	N
38	Fortini plus® e água da torneira	S	N
39	Morango, uva , banana, suco de laranja, damasco seco, mamão e iogurte natural integral	S	S
40	Trophic® pó e água	S	N
41	Fortini plus® e água mineral	S	N
42	Fortini plus® e água fervida	S	N

43	Trophic basic pó® e água mineral		
44	Beterraba, cenoura, brócolis, abóbora cabotiá, músculo (carne vermelha), açúcar, sal, óleo de girassol, leite de caixinha integral e Nutren®	S	N
45	Nutro premium® e PSL (módulo isolado de soro de leite), óleo de girassol, açúcar, leite de caixinha integral	S	N
46	Fresubin original®, leite integral caixinha, nutro premium soy, pré fibra FSI (módulo de fibras solúveis e insolúveis)	S	N
47	Farinha de trigo torrada, fórmula nutro premium soy, pré fibras, leite integral de caixinha, leite desnatado de caixinha, batata inglesa, açúcar, óleo de soja e sal	S	N
48	Peito de frango, abobrinha, chuchu, cenoura, sal, leite de caixinha integral, fórmula nutro premium soy	S	N
49	Batata salsa, cenoura, abobrinha, azeite de oliva, sal, leite de caixinha zero lactose e fórmula nutro premium soy	S	N
50	Trophic basic pó®, proteína isolada do soro de leite (PSL) e leite semidesnatado	S	N
51	Farinha de trigo torrada, fórmula Nutren 1.0®, leite semidesnatado de caixinha, batata inglesa, batata doce, abóbora, óleo de soja e sal	S	N
52	Batata, óleo de soja, sal, açúcar, leite integral de caixinha e Trophic fiber®	S	N
53	Trophic basic®, leite semidesnatado, batata, açúcar demerara, óleo de soja e sal	S	N
54	Batata, óleo de soja, sal, trigo torrado, leite de soja, nutro premium soy	S	N
55	Batata, leite sem lactose de caixinha, trigo torrado, Whey Protein Isolate, Trophic basic®, açúcar, óleo de soja, sal	S	N
56	leite semidesnatado, farinha de trigo torrada, batata cozida, óleo de soja, Maltodextrina e sal	S	N
57	Batata, alho, óleo, água e módulo	S	N
58	Trigo torrado, açúcar, sal, leite semidesnatado de caixinha, batata cozida, Whey Protein Isolate, Trophic basic®	S	N

59	Leite semidesnatado de caixinha, trigo torrado, batata cozida, óleo de cozinha, açúcar, sal, Trophic basic®, Whey Protein Isolate e Fiberfor®	S	N
60	Trophic basic® e leite integral de caixinha	S	N
61	Leite pasteurizado de pacote, Maltodextrina, óleo de milho, Trophic basic® e Fiberfor®	S	N
62	Trophic basic®, energy zip e água	S	N
63	Batata, leite semidesnatado, trigo torrado, óleo de soja, Maltodextrina, sal e Trophic basic®	S	N
64	Batata, sal, açúcar, óleo de soja, trigo, leite semidesnatado de caixinha e nutro premium soy	S	N
65	Batata cozida, sal, azeite, trigo torrado, leite integral de caixinha e nutro premium soy	S	N
66	Leite integral de caixinha, farinha de trigo torrada, batata cozida, óleo de soja e Trophic basic®	N	N
67	Batata cozida, farinha de trigo torrada, óleo de soja, leite semidesnatado, açúcar, sal, Trophic basic® e módulo FSI	N	N
68	Leite semidesnatado em pó, farinha de trigo torrada, batata cozida, óleo, sal, Trophic basic® e Whey Protein Isolate	N	N

* **Legenda:** S = sim; N = não.

5.3.1 Análise microbiológica

Comparado a Legislação vigente, a frequência de amostras que excederam pelo menos um dos microrganismos analisados foi de 94,11% (n = 64). Dentre estes, os microrganismos aeróbios mesófilos foram os mais prevalentes (88,23%, n = 60), seguido de *Staphylococcus coagulase-positiva* (50%, n = 34) e *E. coli* (30,88%, n = 21) (Tabela 10).

Quando analisado cada tipo de formulação enteral, embora a preparação enteral mista tenha apresentado maior número de amostras fora do padrão estabelecido (97,5%, n = 39), seguido da preparação com alimentos (90,90%, n = 10) e fórmula comercial (88,23%, n = 15), não houve diferença significativa (p = 0,35) (Tabela 10).

Quando comparado os microrganismos analisados em relação aos tipos de formulações enterais, embora não tenham apresentado diferença significativa entre eles (p <

0,05), evidencia-se que a preparação enteral mista se sobrepôs em percentuais de contaminação, nos aeróbios mesófilos (92,5%, n = 37) e *E. coli* (40%, n = 16). Enquanto, para *Staphylococcus* coagulase-positiva, a preparação enteral com alimentos apresentou maiores níveis de contaminação (54,54%, n = 6) (Tabela 10).

A preparação com alimentos foi a segunda formulação com maiores níveis de contaminação para aeróbios mesófilos (90,90%, n = 10) e *Escherichia coli* (27,27%, n = 3). A fórmula enteral comercial foi a que apresentou menores níveis de contaminação para os três microrganismos analisados (Tabela 10).

Não houve diferença estatística significativa entre as formulações com relação ao percentual de aeróbios mesófilos acima dos limites recomendados ($p = 0,218$) pela RDC nº 503/2021. Comparando a preparação mista com a fórmula comercial, também não se observou significância estatística ($p = 0,109$).

Logo, não houve diferença significativa entre as formulações com relação ao percentual de *Staphylococcus* coagulase-positiva acima dos limites recomendados ($p = 0,698$). Comparando a preparação com alimentos e a fórmula comercial, também não se observou diferença significativa ($p = 0,488$).

Por fim, não houve diferença significativa entre as formulações com relação ao percentual de *E. coli* acima dos limites recomendados ($p = 0,104$). Comparando a preparação mista com a fórmula comercial, observou-se diferença estatística significativa ($p = 0,036$), ou seja, a formulação mista apresenta um percentual de contaminação maior em relação à fórmula comercial.

Tabela 10: Frequência de microrganismos com valores acima dos limites recomendados.

	Total (N = 68)	FC (n = 17)	PM (n = 40)	PA (n = 11)	p
Amostras que excederam pelo menos um microrganismo	64 (94,11%)	15 (88,23%)	39 (97,5%)	10 (90,90%)	0,35
Aeróbios mesófilos	60 (88,23%)	13 (76,47%)	37 (92,5%)	10 (90,90%)	0,218
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	34 (50%)	7 (41,17%)	21 (52,5%)	6 (54,54%)	0,698
<i>Escherichia coli</i>	21 (30,88%)	2 (11,76%)	16 (40%)	3 (27,27%)	0,104

* **Legenda:** FC = fórmula comercial; PM = preparação mista; PA = preparação com alimentos; padrões RDC nº 503/2021: Aeróbios mesófilos = $<10^3$ UFC/g; *Staphylococcus* coagulase-positiva = <3 UFC/g; *Escherichia coli* = <3 UFC/g; p = análise Qui-quadrado para comparação das formulações enterais frente aos limites recomendados pela legislação.

A contagem mínima entre os microrganismos e formulações enterais foi de <10 UFC, expressando um resultado negativo ou igual a 0. O resultado máximo encontrado na fórmula comercial foi de microrganismos aeróbios mesófilos ($4,106 \times 10^5$ UFC), seguido de *Staphylococcus* coagulase-positiva ($2,783 \times 10^5$ UFC) e *E. coli* ($2,1 \times 10^2$ UFC) (Figura 8).

Na preparação mista, o resultado máximo encontrado foi para microrganismos aeróbios mesófilos ($1,925 \times 10^6$ UFC), seguido de *Staphylococcus* coagulase-positiva ($2,7 \times 10^5$ UFC) e *Escherichia coli* ($4,0 \times 10^3$ UFC) (Figura 9). O resultado de aeróbios mesófilos também foi o mais prevalente na preparação com alimentos ($5,55 \times 10^5$ UFC), seguido de *Staphylococcus* coagulase-positiva ($5,48 \times 10^4$ UFC) e *E. coli* ($3,0 \times 10^1$ UFC) (Figura 10). Analisando o comportamento geral, entre as formulações enterais e os microrganismos pesquisados, os microrganismos aeróbios mesófilos apresentaram maior contagem de unidades formadoras de colônia, seguido de *Staphylococcus* coagulase-positiva e *Escherichia coli* (Figura 11).

Figura 8: Análise de comportamento da contagem dos microrganismos analisados na Fórmula Comercial.

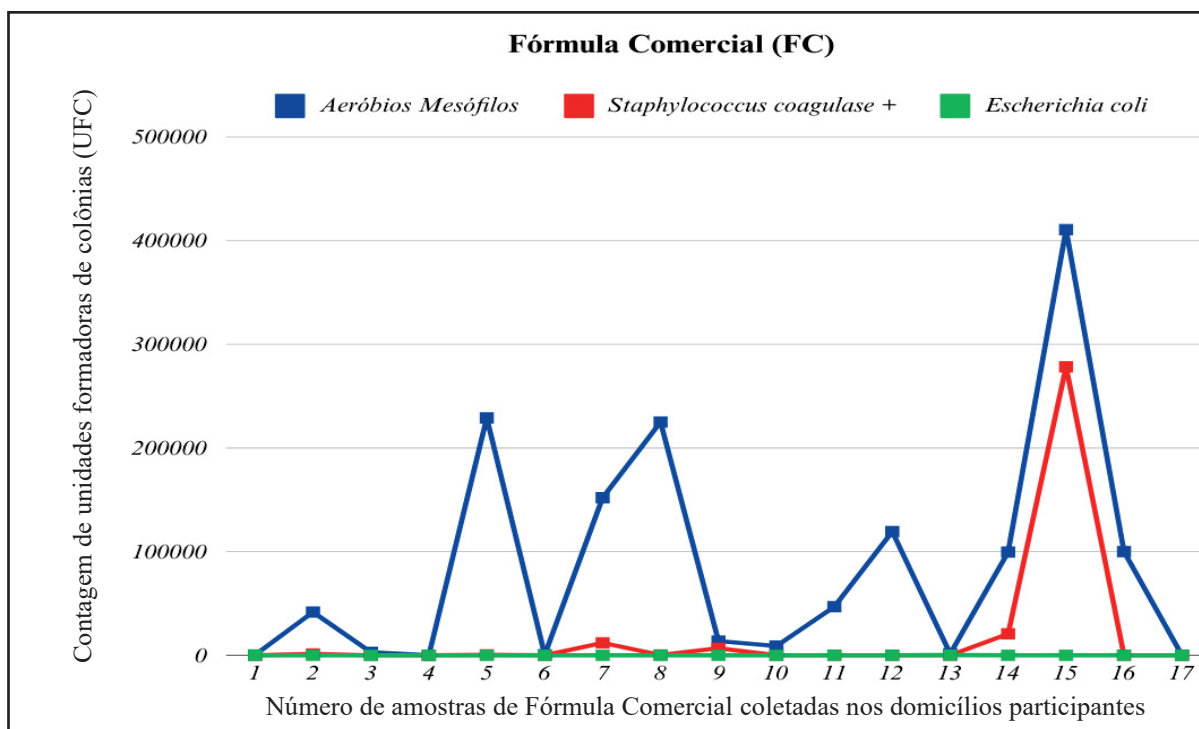


Figura 9: Análise de comportamento da contagem dos microrganismos analisados na Preparação Mista.

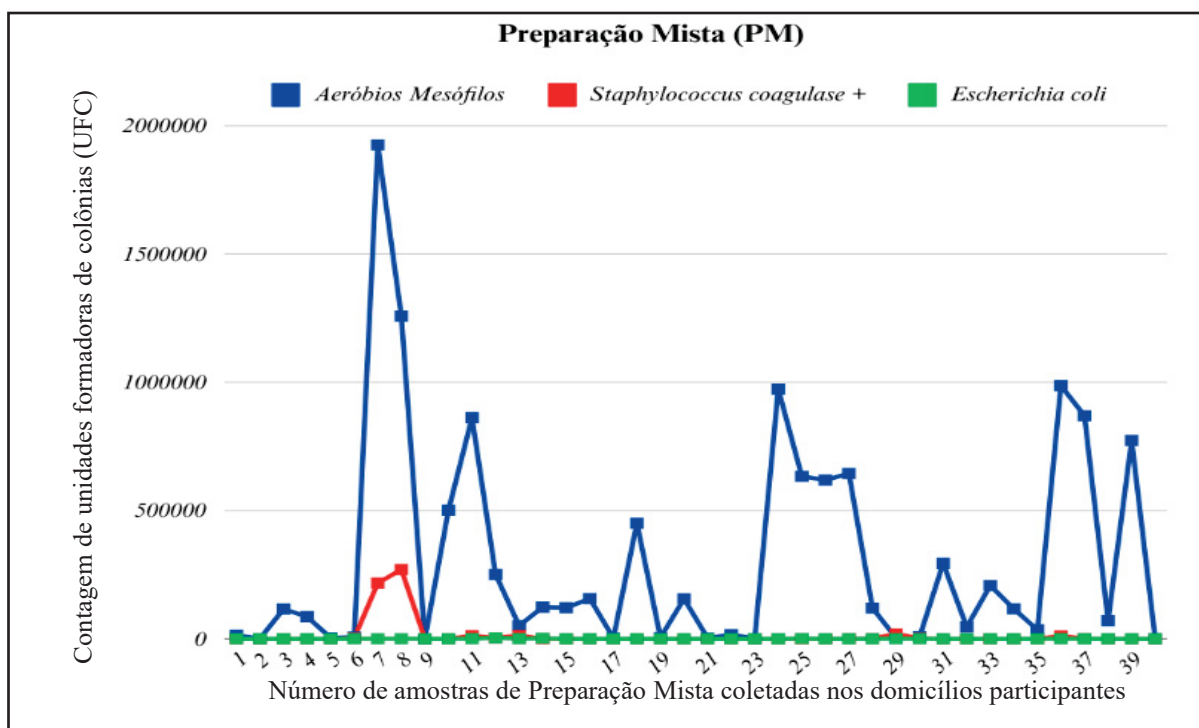


Figura 10: Análise de comportamento da contagem dos microrganismos analisados na Preparação com Alimentos.

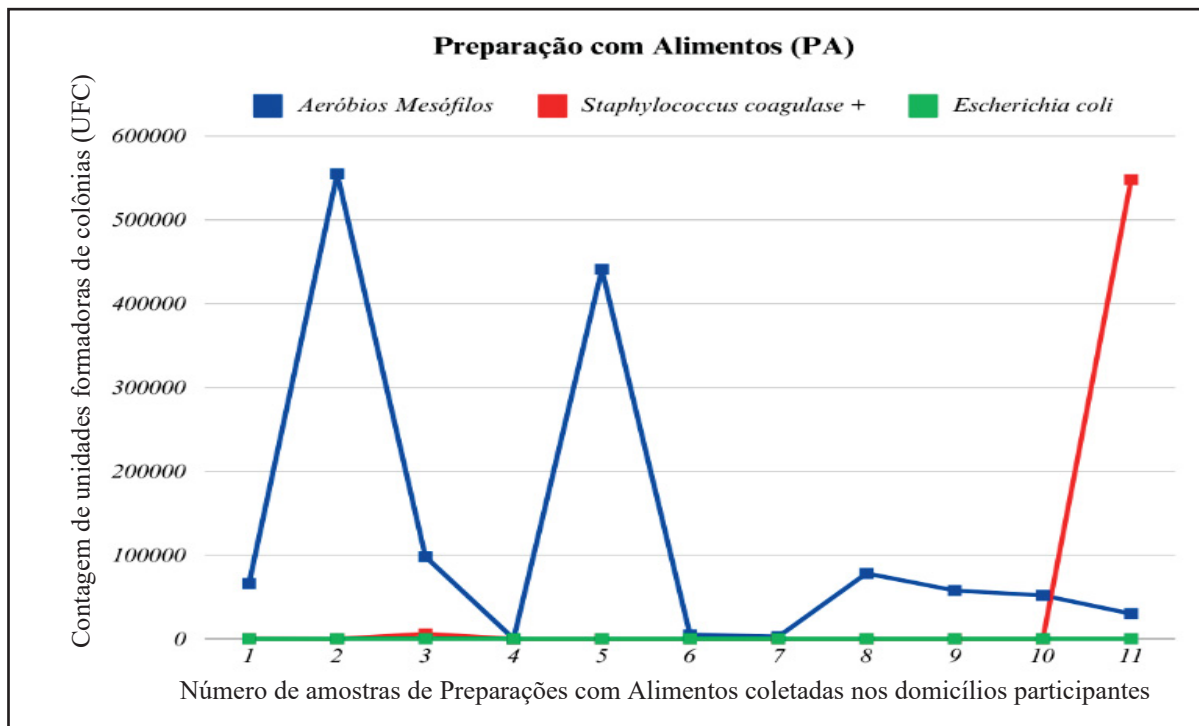
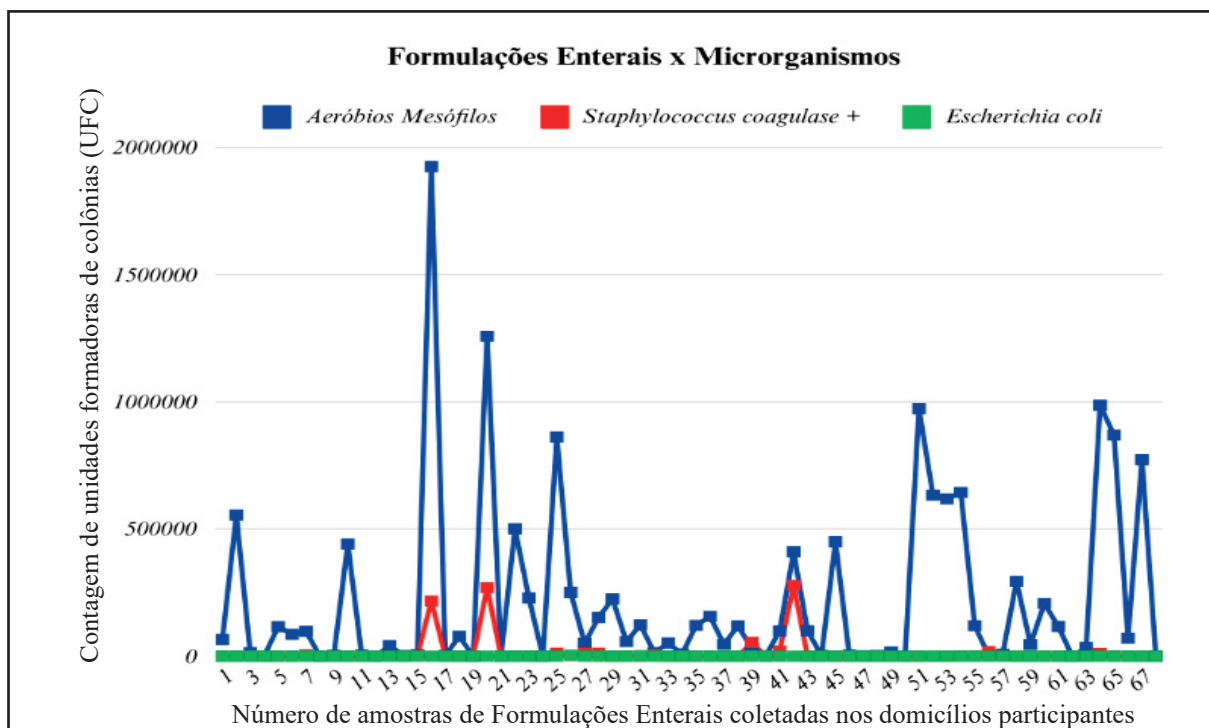


Figura 11: Análise de comportamento da contagem dos microrganismos analisados entre todas as formulações enterais.



6. DISCUSSÃO

A nutrição enteral (NE) é a via preferencial para o reestabelecimento de indivíduos que são incapazes de satisfazer suas necessidades nutricionais por meio da alimentação por via oral e que estão sob risco de desnutrição (Brown *et al.*, 2020).

Em países desenvolvidos, são comumente fornecidas fórmulas enterais comerciais por meio do sistema ou seguro de saúde de pacientes em uso da nutrição enteral em domicílio (Bischoff *et al.*, 2020). Mas, em países em desenvolvimento como o Brasil, mesmo havendo programas que ofertam esta assistência em domicílio, o orçamento para o fornecimento de fórmulas enterais comerciais é limitado, não atendendo a necessidade de todos os usuários (Sousa, Ferreira e Schieferdecker 2014).

Logo, nos últimos anos tem ressurgido o interesse pela nutrição enteral incluindo alimentos na preparação, embora o uso de fórmulas comerciais seja mais recomendado pelos profissionais de saúde por ser considerada mais segura, acerca do aporte nutricional adequado, minimização da contaminação microbiológica e benefícios dos resultados clínicos (Samela *et al.*, 2017; McCormack, Patel e Smith, 2023).

Preparações enterais com alimentos podem incluir laticínios, carnes e produtos “*in natura*” (Santos *et al.*, 2022). Frutas e vegetais, especificamente consumidos crus ou minimamente processados, são considerados alimentos de maior risco, pois podem ser veículos de contaminação por parasitos, devido às más condições de higiene durante a transformação ou preparo, através de manipuladores, superfícies ou equipamentos de alimentos contaminados (Kame-Ngasse, *et al.*, 2023; Oladusu *et al.*, 2023).

A baixa dose infectante para parasitos implica em maiores oportunidades de infecção e maior risco em saúde pública (Rousseau *et al.*, 2018). Este fato é relevante e preocupante, visto que pacientes imunodeficientes ou imunossuprimidos, como os indivíduos que recebem terapia enteral nutricional do presente estudo, podem ter seu quadro agravado, caso recebam alimentos frescos contaminados por diferentes parasitos, inclusive de caráter oportunista (Li *et al.*, 2020; Amouei *et al.*, 2022).

Entretanto, de acordo com nossos conhecimentos, estudos que tenham como enfoque a avaliação da qualidade sanitária no que tange à contaminação por parasitos em alimentos frescos que compõem formulações enterais destinadas a pacientes com

necessidades especiais de cuidados de saúde, são inexistentes.

A detecção de parasitos em alimentos usualmente é subnotificada (Ryan *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2022) e, esbarra na complexidade inerente à execução das metodologias para este fim, e em determinados casos, no alto custo relacionado ao seu isolamento (Behnke *et al.*, 2008; Saelens, Robertson e Gabriel, 2022). Apesar de existir uma ISO para a detecção de protozoários patogênicos dos gêneros *Cryptosporidium* e *Giardia* para vegetais e frutos silvestres (ISO, 2016), não existe normativa padrão para a pesquisa de helmintos em alimentos frescos.

Neste sentido, o presente estudo se mostra ainda mais desafiador, visto que também não há estudos e normativas que padronizaram e avaliaram a presença de contaminantes de origem parasitária em amostras alimentares ainda mais complexas, como as formulações enterais com alimentos frescos, onde a mescla de diferentes alimentos comumente é utilizada para a nutrição de pacientes outrora debilitados.

Desta forma, a padronização de um protocolo para a detecção de ovos de helmintos em preparações enterais compostas por alimentos frescos, poderia ser utilizada e replicada por setores públicos e privados, relacionados com a vigilância de alimentos a fim de garantir maior inocuidade ao produto e proteção da saúde pública. Além disso, a existência de um protocolo validado é relevante para uma pronta resposta em eventual situação de surto relacionado à contaminação por este tipo de alimento (Waindok, Raulf e Strube, 2022)

A detecção de parasitos em alimentos apresenta etapas críticas, tais como a eluição e concentração de parasitos a partir da matriz alimentícia (Collender, *et al.*, 2015). Diversas soluções de eluição/ dissociação pode ser empregadas para este fim, entretanto, no presente estudo optou-se por utilizar soluções compostas de surfactantes (Alconox[®] - 0,1%) e com aminoácidos (Glicina 1M, pH 5,5), aplicadas em duas preparações enterais com alimentos – PEA 1) alface, couve, laranja e agrião; PEA 2) água e morango.

Visto que formulações enterais podem ser compostas por diferentes ingredientes, e que os cuidadores dos pacientes acamados inserem produtos frescos - fato este observado durante as visitas aos domicílios - a padronização e aferição da sensibilidade da metodologia, mediante aplicação de diferentes soluções eluentes demonstra a necessidade de adequação e escolha, dependente do tipo de formulação empregada, ou seja, composta por frutos ou vegetais.

Nossos resultados de experimentos de contaminação artificial permitem inferir que em caso de formulações enterais compostas majoritariamente por vegetais, deve-se utilizar a solução composta por Glicina 1 M, pH 5.5, para a identificação de ovos de helmintos, onde observou-se as maiores taxas de recuperação, utilizando duas doses de ovos de *A. suum* - 66,02% e 55,26%, respectivamente.

Do mesmo modo, em formulações compostas por frutos, observou-se melhor desempenho da utilização de solução de dissociação composta por Alconox[®] - 0,1%, independente da dose aplicada com taxas de recuperação média de 65,17 e 52,19%, respectivamente.

Poucos estudos analisaram a eficácia dos métodos utilizados para a recuperação de ovos de parasitos em vegetais folhosos. Matosinhos *et al.* (2016) e Pineda *et al.* (2021) realizaram a padronização e validação, respectivamente, de uma nova metodologia para pesquisa de helmintos em vegetais folhosos e identificaram que a solução de Glicina (1M, pH 5,5) obteve maior eficácia de recuperação. Como método de homogeneização, estes autores utilizaram somente a técnica manual, com auxílio de saco plástico descartável, ao contrário da presente pesquisa, que comparou duas estratégias de homogeneização, manual ou sob agitador magnético.

Para ambas as PEA, os melhores resultados foram obtidos mediante homogeneização por agitador magnético, independente da dose e solução de dissociação empregada, o que pode ser explicado devido a menores chances de perda de ovos por exigir menor manipulação da amostra e ser utilizado um Becker de vidro que reduz a aderência dos ovos de helmintos (Kleine *et al.*, 2016).

Frutos de baga também vem despertando interesse por pesquisadores nos últimos anos, uma vez que o crescente aumento de seu consumo se depara com o surgimento de surtos alimentares (Barlaam *et al.*, 2022). Frey *et al.* (2019) descreveram uma metodologia que se baseia em uma etapa de centrifugação da água de lavagem de morangos contaminados artificialmente com helmintos contendo 0,1% de Alconox[®] ou Glicina (1M, pH 5,5). Os autores demonstram que as amostras contaminadas com 100 ovos foram detectadas de forma confiável utilizando a solução Alconox, mediante ensaios de biologia molecular, embora não tenham aferido a sensibilidade da técnica de recuperação de ovos por microscopia convencional.

Em nossa padronização com preparações com alimentos, contendo vegetais folhosos (PEA 1) e frutos (PEA 2), foram aplicadas uma dose mais alta (207) e uma mais baixa (76) a fins de comparação, ao contrário dos estudos anteriormente relatados. As diferentes doses utilizadas têm por objetivo fortalecer ainda mais a metodologia aplicada, uma vez que, as soluções utilizadas se mostram eficientes na recuperação de ovos em possíveis cenários diferentes de contaminação.

Ressalta-se que, a presente padronização foi realizada com uma mescla de alimentos triturados e sob visualização a olho nu em microscópio óptico, o que caracteriza um maior desafio na recuperação de ovos de helmintos.

Considera-se que ambos os protocolos que apresentaram as melhores performances são robustos, não somente considerando as taxas de recuperação alcançadas, mas também devido a identificação de outras espécies de helmintos presentes em ambas as PEA em situação natural de contaminação. Em um dos ensaios de contaminação artificial utilizando a solução de Glicina (1M pH 5,5), aplicado para preparação com alimentos contendo alface, agrião, rúcula e laranja, a contaminação por ovos de *Toxocara* sp., foi identificada.

A contaminação por *Toxocara* sp., ocupa a 20^a colocação no ranking da FAO em conjunto com a OMS de classificação de risco de contaminação por parasitos veiculados por diferentes tipos de alimentos (FAO/OMS, 2014). Ressalta-se que uma crítica feita a esse ranking refere-se ao pequeno enfoque dado às variações regionais e consumo específico de determinados alimentos. Entretanto, a doença é frequentemente subnotificada e apresenta diversos agravos à saúde humana, com a maioria dos casos ocorrendo no Brasil, China, Estados Unidos, Coreia, Japão, Índia, Áustria e França (Chen *et al.*, 2018).

O parasitismo em humanos é considerado acidental, onde a toxocaríase pode se manifestar em três síndromes: larva migrans visceral (LMV), larva migrans ocular (LMO) e a toxocaríase neurológica. A toxocaríase ocular ocorre quando as larvas de *Toxocara* migram para o olho, e os sinais e sintomas incluem perda de visão, inflamação ocular ou danos à retina (Ma *et al.*, 2018). A toxocaríase visceral ocorre quando as larvas do parasito migram para vários órgãos do corpo, especialmente para o fígado e secundariamente para o pulmão, coração ou rins, provocando danos aos órgãos e quadro clínico que incluem febre, fadiga, tosse, chiado ou dor abdominal (Chen *et al.*, 2018). Logo, os sinais clínicos da toxocaríase neurológica, não são específicos, levando a um possível subdiagnóstico dessa condição

(Chen *et al.*, 2018).

Além disso, no presente estudo testes de viabilidade aplicados aos ovos detectados em situação natural de contaminação, como a aplicação do azul de Trypan, revelaram que estes se encontravam viáveis. Este procedimento é o mais comumente utilizado, por ser mais fácil e barato para avaliar a viabilidade celular de *Toxocara* sp., e outros helmintos como *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. (Bonatti e Franco, 2014; Waltcher *et al.*, 2023). O azul de Trypan é um reagente colorimétrico que cora as células mortas com uma cor azul, podendo ser observado através de microscopia óptica em baixa resolução. Baseia-se no princípio de que as células vivas possuem membranas celulares íntegras que não permitem a internalização deste corante, enquanto células mortas o incorporam (Sena-Lopes, *et al.*, 2020).

Logo, o encontro de ovos viáveis, com potencial de infectar seres humanos, adiciona relevância em saúde pública, em especial para o grupo vulnerável do presente estudo.

O protocolo utilizando Alconox[®] propiciou a visualização de um ovo de ancilostomatídeo e artrópodes na preparação contemplando morango. O ovo de ancilostomatídeo encontrado durante os ensaios de contaminação artificial, apesar de não ser infectante nesta forma, demonstra importante impacto de contaminação por fezes humanas ou animais, uma vez que, a infecção é transmitida pelo contato com o solo contaminado (Traub *et al.*, 2021).

A ancilostomose é uma infecção crônica comum em humanos com estimativa de 740 milhões de casos especialmente em países com baixo nível socioeconômico localizados em áreas tropicais e subtropicais do mundo segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Gerber *et al.*, 2021). Os ancilostomatídeos em sua fase adulta podem viver por vários anos no intestino humano, sendo de um a três anos para *Ancylostoma duodenale* e de três a dez anos para *Necator americanus* (Jourdan *et al.*, 2018). Este longo período de sobrevivência causa danos significativos na mucosa intestinal do hospedeiro, sendo um dos principais causadores das manifestações clínicas, incluindo a anemia por deficiência de ferro causada pela perda de sangue intestinal no intestino delgado (Stracke, Jex e Traub, 2020).

A identificação de ovos de helmintos durante a padronização, reforça que a inativação de parasitos é influenciada por outros fatores além dos métodos de lavagem, sanitização e soluções de eluição, pois os frutos e vegetais folhosos, apresentam superfície irregular, porosa e rugosa, o que dificulta a remoção de parasitos (Silveira *et al.*, 2023).

A eficiência da utilização de Alconox[®] e Glicina (1M pH 5,5) na recuperação de ovos de helmintos demonstrada neste estudo de padronização pode auxiliar em futuras análises acerca deste tema, contribuindo para que pesquisadores sigam metodologias mais precisas para análise de alimentos.

A solução de Alconox[®] é a solução padronizada para detecção de *Cyclospora cayetanensis*, pela Food and Drug Administration (FDA), esta solução também tem sido utilizada para o isolamento e recuperação de outros protozoários, como *Cryptosporidium* spp., *G. duodenalis* e *T. gondii* em produtos frescos, como frutos de baga e vegetais folhosos (Barlaam *et al.*, 2022; Temesgem, Stigum e Robertson, 2022).

Entretanto, a Glicina (1M pH 5,5) é a solução utilizada na ISO n° 18744, que padroniza o método de detecção e enumeração de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*, ambos protozoários de rota fecal-oral, em vegetais folhosos e frutas vermelhas (ISO 18744, 2016).

No decorrer do estudo foram analisadas formulações enterais comerciais, preparações com alimentos e mistas manipuladas em domicílio. Todas foram destinadas para pesquisa de microrganismos, porém para as análises parasitológicas, somente duas, devido estas conterem alimentos adicionados crus. Em grande parte das amostras são adicionados carnes, leite, arroz e outros ingredientes, que não foram utilizados nos ensaios de controle.

É importante ressaltar que as amostras de formulações enterais oriundas das casas dos pacientes, eram preparadas no momento da coleta, ou seja, o conteúdo da formulação adivinha do que o paciente está habituado a receber, não havendo nenhuma interferência por parte do interesse da pesquisa quanto aos ingredientes a serem utilizados na formulação.

Entretanto, destaca-se que as amostras analisadas, estavam prontas para serem consumidas pelo paciente em uso de nutrição enteral, ou seja, os ingredientes foram previamente higienizados e triturados. Ainda, a mescla de diversos ingredientes adicionados na amostra, que não foram utilizados nos ensaios, pode ter interferido na recuperação de ovos de helmintos por dificultar a visualização e identificação por microscópio óptico.

Contudo, utilizando os preceitos da ISO n° 18744 foi possível identificar a contaminação de uma das amostras dos domicílios por oocisto de *Cryptosporidium* spp. Somente um oocisto foi identificado na lâmina de imunofluorescência, não sendo visualizados esporozoítos. Logo, a PCR foi negativa, que pode ser atribuído à baixa

quantidade de DNA presente (Leal *et al.*, 2024).

Comparado os resultados da análise parasitológica das amostras recebidas, constatamos que a amostra 39 estava imprópria para o consumo humano quando comparado a RDC nº 623/2022, a qual dispõe sobre os limites de tolerância para matérias estranhas em alimentos, definindo que cistos/oocistos de protozoários e artrópodes e fragmentos devem estar ausentes.

Em 2019, um surto de criptosporidiose afetou funcionários adultos de uma mesma empresa no oeste da Noruega, após todos terem bebido do mesmo recipiente de suco de maçã auto prensado. A suspeita da origem da infecção foi o solo contaminado no pomar, durante a coleta da fruta, ou durante o processamento (Robertson *et al.*, 2019). Destaca-se que mesmo com o fruto triturado, o protozoário continua infectante.

Logo, durante os ensaios de padronização, e na etapa de análise de contaminação por helmintos na amostra 39, utilizando o protocolo 4 – Alconox[®] e agitador magnético, foi identificado a presença de artrópode. Em saúde pública, é ressaltada a importância do combate aos artrópodes por serem possíveis carreadores de agentes infecciosos, e consequente a transmissão de doenças, onde algumas são consideradas de maior mortalidade e morbidade a nível mundial (Brasil, 2019b).

Apesar de não ter sido observado amplificação de DNA para *T. gondii* ao realizar análise molecular das amostras 7 e 39, o risco de contaminação por este protozoário no ambiente domiciliar não pode ser descartado, pois animais de estimação, como gatos foram vistos com bastante frequência nas casas visitadas, onde muitas vezes os animais se encontravam dentro do domicílio e próximo ou no interior da cozinha, onde ocorre a manipulação da NE.

Visto que as preparações com alimentos podem envolver diversos ingredientes, a contaminação microbiológica também se destaca como um dos motivos de preocupação quanto a administração deste tipo de formulação enteral, pois demonstra maiores níveis de contaminação comparado a fórmulas comerciais, as quais exigem menor manipulação (Santos *et al.*, 2022; Kozow *et al.*, 2023).

Durante as análises quanto a presença de microrganismos em formulações enterais detectamos que de 68 amostras analisadas, 64 (94,11%) excederam ao menos o limite de segurança de um microrganismo, quando comparado a RDC nº 503/2021 que estabelece os

limites de microrganismos na nutrição enteral. E de todas as amostras recebidas e analisadas, a preparação mista se sobrepôs em percentuais de contaminação em relação as demais preparações, para aeróbios mesófilos e *E. coli*, demonstrando que 92,5% e 40% das amostras, respectivamente, estavam em desacordo com a legislação vigente. Entretanto, não houve diferença significativa.

É importante destacar que as preparações mistas também demonstraram um número surpreendente quanto a contagem de microrganismos totais para aeróbios mesófilos e *E. coli*, comparado as demais fórmulas. O maior número encontrado de bactérias em uma única amostra de preparação mista foi de $1,925 \times 10^6$ UFC de aeróbios mesófilos e $4,0 \times 10^3$ UFC para *E. coli*.

Vieira *et al.* (2018) e Ojo *et al.* (2020) que tinham como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de formulações enterais, revelaram que os maiores níveis de contaminação microbiana ocorrem em preparações enterais mistas, que inclui fórmula e alimento na composição, quando comparado às fórmulas comerciais, manipuladas em ambiente domiciliar, o que vai de encontro com nossos resultados.

Ainda, os percentuais de aeróbios mesófilos foram os mais elevados, frente a RDC nº 503/2021, quando comparado aos demais microrganismos analisados, onde de 68 amostras analisadas, 60 (88,23%) estavam inadequadas. Quando comparado a legislação, a presença de aeróbios mesófilos também prevaleceu na fórmula comercial (76,4%) e preparação enteral com alimentos (90,90%).

Esses resultados são preocupantes, pois a alta contagem de mesófilos pode indicar a presença de patógenos, uma vez que a temperatura durante a preparação, armazenamento ou distribuição da formulação foi negligenciada (Salazar-Llorente *et al.*, 2021).

E. coli, comumente pesquisada em formulações enterais e considerada a principal bactéria indicadora de contaminação fecal (Adibi *et al.*, 2022), foi detectada em preparações enterais mistas. Embora a maioria das cepas de *E. coli* sejam inofensivas, alguns sorotipos podem causar intoxicação alimentar grave, podendo ser fatal para pacientes com função imunológica deficiente, como os que utilizam a NE, ao ocasionar diarreia com sangue, desidratação e até insuficiência renal (Bahramian *et al.*, 2023).

Além disso, a preparação inadequada dos alimentos pode contribuir para a contaminação da nutrição entérica por *S. aureus*, enquanto estas estirpes bacterianas e outras

espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivas também podem libertar enterotoxinas (Moazen *et al.*, 2014).

Neste estudo, este grupo de bactéria foi detectado em maiores quantidades em preparações enterais com alimentos, representando 54,54% das amostras em desacordo a legislação, chegando a ser contabilizada com valores de $5,48 \times 10^4$ UFC presente em uma única amostra. Este resultado pode denotar más condições higiênico-sanitárias dentro dos domicílios (Santos, Botoni e Morais, 2013; Bahramian *et al.*, 2023).

Nas visitas aos domicílios para coleta das amostras, foram identificados também pontos críticos quanto as etapas de manipulação das formulações enterais: higienização das mãos inadequada, presença de animais e moscas na área de manipulação, lixo próximo aos alimentos, utilização de utensílios de madeira, ausência da sanitização de frutas e vegetais, não utilização de água filtrada, entre outros.

Tais inadequações podem corresponder aos resultados encontrados quanto à contaminação bacteriológica e parasitológica, uma vez que, os patógenos podem ser introduzidos no ambiente doméstico através de alimentos crus naturalmente contaminados, transferidos do ambiente (transportados por animais ou insetos) ou transferidos de outra pessoa (contaminação fecal-oral e aerossolização) (Borrucco e Quinlan, 2017). Sob as condições adequadas em casa, os microrganismos especialmente, têm potencial para sobreviver, crescer, espalhar-se para outras superfícies, persistir por longos períodos e contaminar os alimentos (Borrucco e Quinlan, 2017).

Visto que grande parte das amostras analisadas quanto a presença de microrganismos ultrapassa os limites assegurados para formulações enterais, estipulado pela RDC nº 503/2021 e a contagem de total de microrganismos exorbitantes, este estudo adiciona informações importantes aos demais já realizados quanto a contaminação microbiológica na NED. Entretanto, se diferencia ao demonstrar as informações referentes aos dados brutos da contagem total de microrganismos, considerada relevante, uma vez que se trata de pacientes muitas vezes acamados e debilitados.

Devido à crescente dependência de atendimento nutricional ambulatorial, a nutrição enteral domiciliar (NED), reconhecida por ser uma modalidade de intervenção nutricional eficaz e relevante, tem sido cada vez mais utilizada por ser capaz de otimizar a transição

alimentar e melhorar a qualidade de vidas dos pacientes, com menores custos (Melo *et al.*, 2020).

Logo, dados epidemiológicos de diversos países como a Europa, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia indicam que uma proporção substancial de doenças transmitidas por alimentos é atribuível a práticas inadequadas de preparação de alimentos nas casas dos consumidores (Redmond e Griffith, 2003).

Os resultados expressivos quanto aos indicadores bacteriológicos nas formulações enterais analisadas neste trabalho, a detecção de *Cryptosporidium*, protozoário de caráter oportunista aliado as práticas inadequadas observadas quanto a manipulação de alimentos, mostram a necessidade de melhoria nos processos de TNE. Ademais, ressalta-se a necessidade de utilizar técnicas sofisticadas e que propiciem a identificação das espécies dos protozoários, visto que nem todas apresentam potencial infectante para seres humanos (Ryan *et al.*, 2021). De todo modo, as técnicas empregadas de IMS e RID são robusta, sendo possível identificar um risco potencial e a necessidade de melhoria nos processos.

Considerando a incidência de bactérias indicadoras nas formulações enterais analisadas e que muitas das preparações contêm vegetais e frutos frescos, utilizados crus, medidas a serem tomadas para redução do risco de contaminação devem ser tomadas. As precauções a serem realizadas devem incluir o armazenamento, preparo e higienização correta das mãos dos manipuladores de alimentos, bem como dos utensílios e locais onde ocorrem os preparos (SBNPE, 2018).

Ainda, utilização de água potável e a higienização correta dos produtos frescos através da cloração da água utilizada em todo o processo (SBNPE, 2018). Bem como a técnica de remoção mecânica em água corrente para remoção de ovos, cistos e oocistos de parasitos em produtos frescos, pois somente a cloração não se faz suficiente neste caso (Eslashi *et al.*, 2023).

O desenvolvimento de métodos para a detecção e determinação da viabilidade de estágios infecciosos de patógenos no ambiente fornece ferramentas importantes para a identificação e compreensão das rotas de transmissão, para determinar a importância das matrizes (solo, água e alimentos) envolvidas na transmissão, e para avaliar o risco de infecção (García-Rodríguez, Köster e Ponce-Gordo, 2022)

Logo, este estudo aborda que bactérias estão frequentemente presentes nas

formulações enterais, e que a existência de parasitos não está descartada. Os dados brutos quanto a contagem de microrganismos indicadores é uma novidade comparado aos demais estudos já existentes que objetivaram analisar a qualidade da nutrição enteral no domicílio, uma vez que somente compararam os resultados perante a RDC nº 503/2021.

Além disso, destaca-se a necessidade de criação de legislações mais restritivas quanto a qualidade de formulações enterais, dado que, não há uma RDC que aborde a presença de parasitos na Nutrição Enteral, assim como a necessidade de um controle rigoroso acerca da qualidade sanitária, visando reduzir o risco de uma grande variedade de doenças de origem alimentar.

7. CONCLUSÕES

1. A metodologia padronizada para a pesquisa de helmintos em formulações enterais preparadas com alimentos crus se mostrou sensível e eficiente para a detecção de ovos de parasitos nesta matriz alimentar. Os resultados referentes a contaminação natural por ovos de *Toxocara* sp. e ancilostomatídeos em produtos frescos reforçam que a análise quanto a presença de parasitos nestes alimentos deve ser preconizada, levando em conta a frequência com que são utilizados em sua forma crua e os poucos estudos realizados acerca deste tema.

2. Devido à inexistência de um método padronizado para análise de contaminação por parasitos nesta matriz alimentar, esta pesquisa poderá contribuir para futuras análises quanto à sua presença na NE e propiciar agilidade em investigações quanto possíveis surtos alimentares, uma vez que se trata de uma padronização de baixo custo e fácil de ser reproduzida.

3. A contaminação por *Cryptosporidium* spp., evidenciada neste estudo ressalta a necessidade do monitoramento da contaminação de formulações enterais também para protozoários patogênicos, demonstrando que os processos de sanitização dos alimentos não foram eficazes.

4. A frequente presença das bactérias indicadoras aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* coagulase-positiva e *E. coli* explicitam que existem muitas falhas nas etapas de manipulação dos diferentes tipos de formulações enterais em domicílio, principalmente quando são incluídos alimentos na composição. Estes resultados reforçam a necessidade de orientação

para os manipuladores de alimentos quanto as boas práticas de higiene pessoal e dos utensílios utilizados, bem como a melhoria e controle dos processos, incluindo a utilização de água filtrada e/ou fervida.

5. Para estudos futuros, um cruzamento de dados quanto a presença de indicadores microbiológicos e parasitos, frente a sintomatologia do paciente em uso da NED, e a rastreabilidade das possíveis fontes de contaminação se faz válida. Assim como a aplicação de uma cartilha de boas práticas de formulações enterais administradas em domicílio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANHOLT, D.; PHILOMENE, J., V.; NIWA, L., M., S.; DIAS, M., B.; TOLETO, D.; CIOSAK, S., I. Inquérito Brasileiro Sobre Terapia de Nutrição Domiciliar: panorama atual. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, p. 127-138, 24 jan. 2021.

ADIBI, S.; AFSHARI, A.; NOROUZY, A.; NEMATY, M.; EHSANI, A.; HASHEMI, M. Microbiological quality of hospital-prepared blenderised tube feeding. **Journal Of Human Nutrition And Dietetics**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 181-190, 4 ago. 2022.

AHMADPOUR, E.; SAFARPOUR, H.; XIAO, L.; ZAREAN, M.; HATAM-NAHAVANDI, K.; BARAC, A.; PICOT, S.; RAHIMI, MT.; RUBINO, S.; MAHAMI-OSKOU EI, M.; SPOTIN, A.; NAMI, S.; BAGHI, HB. Cryptosporidiosis in HIV-positive patients and related risk factors: A systematic review and meta-analysis. **Parasite**, v. 27, p. 27, 2020.

AHMED, S., A.; KARANIS, P. An overview of methods/techniques for the detection of *Cryptosporidium* in food samples. **Parasitology Research**, v. 117, n. 3, p. 629-653, 19 jan. 2018.

AKANKSHA, K.; KUMARI, A.; DUTTA, O.; PRASANTH, A.; DEEBA, F.; SALAM, N. Prevalence of soil-transmitted helminth infections in HIV patients: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 11055, 8 jul. 2023.

ALTMAN, AS.; RANDERS, L.; RAO, G. Comparison of Trypan Blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. **Biotechnol Prog** 9:671–674, 1993.

AMAHMID, O.; GUAMRI, Y., E.; RAKIBI, Y.; OUIZAT, S.; YAZIDI, M.; RAZOKI, B.; RASSOU, K., K.; ACHAQ, H.; BASLA, S.; ZERDEB, M., A. Pathogenic parasites in vegetables in the Middle East and North Africa: occurrence of *Ascaris* eggs and *Giardia* cysts, and epidemiological implications. **Food Control**, [S.L.], v. 143, p. 109323, jan. 2023.

AMOAH, ID.; SINGH, G.; STENSTRÖM, TA.; REDDY, P. Detection and quantification of soil-transmitted helminths in environmental samples: A review of current state-of-the-art and future perspectives. **Acta Tropica**, v. 169, p. 187-201, maio 2017.

AMOUEI, A.; SARVI, S.; MIZANI, A.; BAGHER, M., H-S.; SALEHI, S.; JAVIDNIA, J.; ABDOLLAH, S.; HOSSEINI, S. A.; AMUEI, F.; ALIZADEH, A.; SHABANZADE, S.; GHOLAMI, S.; DARYAN, A. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in meat-producing animals in Iran. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, 11 jul. 2022.

ANKARKLEV, J., JERLSTRO.; M-HULTQVIST, J.; RINGQVIST, E.; TROELL, K.; SVARD, SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nat Rev Microbiol**, 8:413-422, 2010.

ASTIAZARAN-GARCIA, H.; LOPEZ-TEROS, V.; VALENCIA, ME.; 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**, v. 57, n. 3-4, p. 228-233, 2010.

BARLAAM, A.; TEMESGEN, TT.; TYSNES, KR.; RINALDI, L.; FERRARI, N.; SANNELLA, AR.; NORMANNO, G.; CACCIÒ, SM.; ROBERTSON, LJ.; GIANGASPERO, A. Contamination of fresh produce sold on the Italian market with

Cyclospora cayetanensis and *Echinococcus multilocularis*. **Food Microbiology**, v. 98, p. 103792, set. 2021.

BARLAAM, A.; SANNELLA, AR.; FERRARI, N.; TEMESGEN, TT.; RINALDI, L.; NORMANNO, G.; CACCIÒ, SM.; ROBERTSON, LJ.; GIANGASPERO, A. Ready-to-eat salads and berry fruits purchased in Italy contaminated by *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 370, p. 109634, jun. 2022.

BAHRAMIAN, B.; SARABI-JAMAB, M.; TALEBI, S.; RAZAVI, SMA.; REZAIE, M. Designing blenderized tube feeding diets for children and investigating their physicochemical and microbial properties and Dietary Inflammatory Index. **Nutr Clin Pract**. 38:360-375, 2023.

BARBOSA, A. D.; EGAN, S.; FENG, Y.; XIAO, L.; BALOGUN, S.; RYAN, U. Zoonotic *Cryptosporidium* and *Giardia* in marsupials—an update. **Parasitology Research**, v. 123, n. 1, 1 jan. 2024.

BARTELT, L., A; PLATTS-MILLS, J., A. *Giardia*: a pathogen or commensal for children in high-prevalence settings? *Curr Opin Infect Dis.* (5):502-7, Oct., 2016.

BARTELS, A. S; ANDRADE, A.D.; NEUMANN, E.; SILVA, A.M. Identificação de portadores de *Staphylococcus* enterotoxigênicos e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1450-1453, dez. 2009.

BAXTER, YC.; DIAS, MC.; MACULEVICIUS, J.; CECCONELLO, I.; COTTELENG, B.; WAITZBERG, DL. Economic Study in Surgical Patients of a New Model of Nutrition Therapy Integrating Hospital and Home vs the Conventional Hospital Model. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 29, n. 1S, jan. 2005.

BEHNKE, J., M.; BUTTLE, D., J.; STEPEK, G.; LOWE, A.; DUCE, I., R. Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 29, 2008.

BELAZ, S.; GANGNEUX, JP.; DUPRETZ, P.; GUIGUEN, C.; ROBERT-GANGNEUX, F. A 10-Year Retrospective Comparison of Two Target Sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* Detection by Quantitative PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1294-1300, 4 fev. 2015.

BENJELLOUN TOUIMI, G.; BENNANI, L.; BERRADA, S.; MOUSSA, B.; BENNANI, B. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus* sp. isolated from food, food contact surfaces and food handlers in a Moroccan hospital kitchen. **Letters in Applied Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 241-251, 11 fev. 2020.

BENNETT, K.; HJELMGREN, B.; PIAZZA, J. Blenderized Tube Feeding: Health Outcomes and Review of Homemade and Commercially Prepared Products. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 35, n. 3, p. 417-431, 2 maio 2020.

BETSON, M.; NEJSUM, P.; STOTHARD, JR. From the twig tips to the deeper branches: new insights into evolutionary history and phylogeography of *Ascaris*. In: *Ascaris: the neglected parasite*. **London: Elsevier**, p. 265–85, 2013.

BILGIÇ, F.; AKDUR, ÖZTÜRK, E.; BABAT, SÖ.; BABAOĞLU, A.; DIRIM, ERDOĞAN, D.; KORKMAZ, M. Determination of Parasitic Contamination in Vegetables Collected from Local Markets in İzmir Province, Türkiye. **Turkiye Parazit Derg.**, 29;47(2):105-111, jun. 2023.

BISCHOFF, SC.; AUSTIN, P.; BOEYKENS, K.; CHOURDAKIS, M.; CUERDA, C.; JONKERS-SCHUITEMA, C.; LICHOTA, M.; NYULASI, I.; SCHNEIDER, SM.; STANGA, Z.; PIRONI, L. ESPEN practical guideline: Home enteral nutrition. **Clinical Nutrition**, v. 41, n. 2, p. 468-488, fev. 2022.

BISCHOFF, SC.; BERNAL, W.; DASARATHY, S.; MERLI, M.; PLANK, LD.; SCHÜTZ, T.; PLAUTH, M. ESPEN practical guideline: Clinical nutrition in liver disease. **Clin Nutr.** 39(12):3533-3562, 2020.

BONATTI, T., R.; FRANCO, R., M., B. Real scale environmental monitoring of zoonotic protozoa and helminth eggs in biosolid samples in Brazil. **Journal Of Parasitic Diseases**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 633-642, 5 set. 2014.

BORRUSO, P., A.; QUINLAN, J., J. Prevalence of Pathogens and Indicator Organisms in Home Kitchens and Correlation with Unsafe Food Handling Practices and Conditions. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 80, n. 4, p. 590-597, abr. 2017.

BOULLATA, JI.; CARRERA, AL.; HARVEY, L.; ESCURO, AA.; HUDSON, L.; MAYS, A.; MCGINNIS, C.; WESSEL, JJ.; BAJPAI, S.; BEEBE, ML.; KINN, TJ.; KLANG, MG.; LORD, L.; MARTIN, K.; POMPEII-WOLFE, C.; SULLIVAN, J.; WOOD, A.; MALONE, A.; GUENTER, P. ASPEN Safe Practices for Enteral Nutrition Therapy. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 41, n. 1, p. 15-103, 5 nov. 2016.

BOURLI, P.; ESLAHI, AV.; TZORAKI, O.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: a review of worldwide outbreaks – an update 2017–2022. **Journal of Water and Health**, 4 set. 2023.

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**, v. 12, n. 6, p. e0006553, 7 jun. 2018.

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. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 623, de 9 de março de 2022 - Dispõe sobre os limites de tolerância para matérias estranhas em alimentos, os princípios gerais para o seu estabelecimento e os métodos de análise para fins de avaliação de conformidade.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 11, de 26 de janeiro de 2006 - Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Funcionamento de Serviços que prestam Atenção Domiciliar.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 503, de 27 de maio de 2021 - Dispõe sobre os requisitos mínimos exigidos para a Terapia de Nutrição Enteral.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Departamento de Saneamento. **Manual de Saneamento**. Ministério da Saúde, 2019b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 373, de 27 de fevereiro de 2002 - Aprova a Norma Operacional da Assistência à Saúde – NOAS-SUS 01/2002.

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**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Caderno de Atenção Domiciliar - Cuidados em terapia nutricional**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Manual de terapia nutricional na atenção especializada hospitalar no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. **Manual de monitoramento e avaliação: Programa Melhor em Casa**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016 b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Alimentação e Nutrição. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BROWN, T.; ZELIG, R.; RADLER, D., R. Clinical Outcomes Associated With Commercial and Homemade Blenderized Tube Feedings: A Literature Review. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 35, n. 3, p. 442-453, 22 abr. 2020.

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

CAI, W.; RYAN, U.; XIAO, L.; FENG, Y. Zoonotic giardiasis: an update. **Parasitology Research**, v. 120, n. 12, p. 4199-4218, 8 out. 2021.

CARADONNA, T.; MARANGI, M.; DEL, CHIERICO, F.; 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**, v. 67, p. 67- 75, out. 2017.

CARTER, H.; JOHNSON, K.; JOHNSON, TW.; SPURLOCK, A. Blended tube feeding prevalence, efficacy, and safety: What does the literature say? **Journal of the American Association of Nurse Practitioners**, v. 30, n. 3, p. 150-15, março 2018.

CHALMERS, R., M.; DAVIES, A., P.; TYLER, K. *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.

CHANDRA, V.; TORRES, M.; ORTEGA, Y. R. Efficacy of Wash Solutions in Recovering *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum*, and *Toxoplasma gondii* from Basil. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 8, p. 1348– 1354, 1 ago. 2014.

CHÁVEZ-RUVALCABA, F.; CHÁVEZ-RUVALCABA, MI.; MORAN, SANTIBAÑEZ, K.; MUÑOZ-CARRILLO, JL.; LEÓN, CORIA, A.; REYNA, MARTÍNEZ, R. Foodborne Parasitic Diseases in the Neotropics – a review. **Helminthologia**, v. 58, n. 2, p. 119-133, 1 jun. 2021.

CHECKLEY, W.; WHITE, AC JR.; JAGANATH, D.; ARROWOOD, MJ.; CHALMERS, RM.; CHEN, X-M.; FAYER, R.; GRIFFITHS, JK.; GUERRANT, RL.; HEDSTROM, L.; HUSTON, CD.; KOTLOFF, KL.; KANG, G.; MEAD, JR.; MILLER, M.; PETRI, WA JR.; PRIEST, JW.; ROOS, DS.; STRIEPEN, B.; THOMPSON, RCA.; WARD, HD.; VAN, VOORHIS WA.; XIAO, L.; ZHU, G.; HOUP, ER. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. **The Lancet Infectious Diseases** 15, 85–94, 2015.

CHEN, J.; LIU, Q.; LIU, G-H.; ZHENG, W-B.; HONG, S-J.; SUGIYAMA, H.; ZHU, X-Q.; HANY, M.; ELSHEIKHA, H, M. Toxocariasis: a silent threat with a progressive public health impact. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 7, n. 1, 13 jun. 2018.

COELHO, CH.; DURIGAN, M.; LEAL, DAG.; SCHNEIDER, AB.; FRANCO, RMB.; SINGER, SM. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. e0006005, 24 out. 2017.

COLLENDER, P., A.; KIRBY, A., E.; ADDISS, D., G.; FREEMAN, M., C.; REMAIS, J., V. Methods for Quantification of Soil-Transmitted Helminths in Environmental Media:

current techniques and recent advances. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 31, n. 12, p. 625-639, dez. 2015.

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, CA.; WILKINSON, N.; NICHOLS, RA.; BARKER, K.; SMITH, HV. 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**, v. 109, n. 3, p. 215–221, jun. 2006.

COSTA, D.; RAZAKANDRAINIBE, R.; BASMACIYAN, L.; RAIBAUT, J.; DELAUNAY, P.; MORIO, F.; GARGALA, G.; VILLIER, V.; MOUHAJIR, A.; LEVY, B.; RIEDERI, C.; LARRECHE, S.; LESTHELLE, S.; CORON, N. L.; MENU, E.; DEMAR, M.; POMMIER, V. S.; BLANC, V.; VALOT, S.; DALLE, F.; FAVENNEC, L. A summary of cryptosporidiosis outbreaks reported in France and overseas departments, 2017–2020. **Food and waterborne parasitology**, v. 27, p. e00160–e00160, 1 jun. 2022.

DA COSTA DANTAS, LM.; DE MEDEIROS, MAIA, CM.; DA SILVA, CHAVES, DAMASCENO, KSF.; MONT'ALVERNE, JUCÁ SEABRA L.; CHAVES, G.; DE ASSIS, CF.; DE SOUSA JÚNIOR, FC. Prevalence of helminths in fresh vegetables: a narrative literature review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 19 out. 2022.

DARDONA, Z.; HINDI, A.; HAFIDI, M.; BOUMEZZOUGH, A.; BOUSSAA, S. The occurrence of *Toxoplasma gondii* on raw leafy vegetables in Gaza - Palestine. **Journal of Food Protection**, v. 84, n. 2, 2021.

DE LIMA CORVINO, DF, HERRALL, S. Ascariíase. [Atualizado em 16 de março de 2020]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430796/> 2020.

DE LUIS, DA.; IZAOLA, O.; CUELLAR, LA.; TERROBA, MC.; CABEZAS, G.; DE LA FUENTE, B. Experience over 12 years with home enteral nutrition in a healthcare area of Spain. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 26, n. 1, p. 39-44, 2013.

DE OLIVEIRA JJ; SILVA EKA, SANO MIB; SCHIEFERDECKER MEM; KOPRUSZYNSKI CB. Livro de receitas: nutrição enteral com alimentos. Curitiba: Universidade Federal do Paraná: Grupo BHEN, 2022.

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

DONG, S.; YANG, Y.; WANG, Y.; YANG, D.; YANG, Y.; SHI, Y.; LI, C.; LI, L.; CHEN, Y.; JIANG, Q.; ZHOU, Y. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. **Acta Parasitologica**, 65, 882–889, 2020.

DUMÈTRE, A.; AUBERT, D.; PUECH, PH.; HOHWEYER, J.; AZAS, N.; VILLENA, I. Interaction Forces Drive the Environmental Transmission of Pathogenic Protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 905–912, 1 fev. 2012.

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

ELSE, KJ.; KEISER, J.; HOLLAND, CV.; GRENCIS, RK.; SATTELLE, DB.; FUJIWARA, RT.; BUENO, LL.; ASAOLU, SO.; SOWEMIMO, OA.; COOPER, PJ. Whipworm and roundworm infections. **Nature Reviews Disease Primers**, 6, 44, 2020.

ENGLISH, ED.; GUÉRIN, A.; TANDEL, J.; STRIEPEN, B. Live imaging of the *Cryptosporidium* parvum life cycle reveals direct development of male and female gametes from type I meronts. **PLOS Biology**, v. 20, n. 4, p. e3001604, 18 abr. 2022.

EPP., LM.; SALONEN, BR.; HURT, RT.; MUNDI, MS. Cross-sectional Evaluation of Home Enteral Nutrition Practice in the United States in the Context of the New Enteral Connectors. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 43, n. 8, p. 1020–1027, 7 fev. 2019.

EKMAN, C., C., J.; CHIOSSI, M., F., DO VALLE.; MEIRELES, L., R.; ANDRADE, J.; HEITOR, FRANCO DE; FIGUEIREDO, W., M.; MARCIANO, M., A., M.; LUNA, E., J., DE ALBUQUERQUE. Case-control study of an outbreak of acute toxoplasmosis in an industrial plant in the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v. 54, n. 5, p. 239-244, out. 2012.

ESLAHI, AV.; OLFATIFAR, M.; ZAKI, L.; KARIMIPOUR, SARYAZDI, A.; BARIKBIN, F.; MALEKI, A.; ABDOLI, A.; BADRI, M.; KARANIS, P. Global prevalence of intestinal protozoan parasites among food handlers: A systematic review and meta-analysis. **Food Control**, v. 145, p. 109466, mar. 2023.

FANTINATTI, M.; LOPES-OLIVEIRA, LAP.; CASCAIS-FIGUEREDO, T.; AUSTRIACO-TEIXEIRA, P.; VERISSIMO, E.; BELLO, AR.; DA-CRUZ, AM. 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. **Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites**. Microbiological Risk Assessment Series No. 23. Rome. 302pp, 2014.

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, FP.; CALDART. ET.; FREIRE, RL.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; FREITAS, FM.; MIURA. AC.; MAREZE, M.; MARTINS, FDC.; URBANO, MR.; SEIFERT, AL.; NAVARRO, IT. The effect of water source and soil supplementation on parasite contamination in organic vegetable gardens. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 30 ago. 2018.

FIDJELAND, J.; NORDIN, A.; PECSON, BM.; NELSON, KL.; VINNERÅS, B. Modeling the inactivation of *Ascaris* eggs as a function of ammonia concentration and temperature. **Water Research**, 83, 153-160, 2015.

FREITAS, R.; NERO, L.A.; CARVALHO, A.F.. Technical note: enumeration of mesophilic aerobes in milk. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 92, n. 7, p. 3069-3073, jul. 2009. American Dairy Science Association.

FREY, CF.; OAKLEY, JR.; LOBANOV, VA.; MARREROS, N.; SCHURER, JM.; LALONDE, LF. A novel protocol to isolate, detect and differentiate taeniid eggs in leafy greens and berries using real-time PCR with melting curve analysis. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2019.

GALINDO, CO.; BEUX, MR.; DA COSTA, RL.; UNIAT, KC.; LEOBET, J.; FERREIRA, SMR.; MEDEIROS, CO.; SCHIEFERDECKER, MEM.; STANGARLIN-FIORI, L. Home-Prepared Enteral Tube Feeding: Evaluation of Microbiological Contamination, Hygiene, and the Profile of the Food Handler. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 36, n. 3, p. 704–717, 25 set. 2020.

HAIPOUR, 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**, v. 95, p. 103704-103712, maio 2021.

HANCOCK-ALLEN, J.; ALDEN, ÑNB.; CRONQUIST, AB. *Cryptosporidiosis* outbreak at an academic animal research laboratory-Colorado, 2014. **Am J Ind Med**. Feb;60(2):208-214, 2017

HILL, DE.; DUBEY, JP. *Toxoplasma gondii* as a Parasite in Food: Analysis and Control. **Microbiol Spectr**. 4(4), aug., 2016.

HILL, D.; DUBEY, JP. *Toxoplasma gondii*: transmissão, diagnóstico e prevenção. **Microbiologia Clínica e Infecção**. 8(10): 634 – 640, 2002.

HOLLAND C. *Ascaris*: o parasita negligenciado. **Londres: Elsevier**; 2013.

HOLLAND, C.; SEPIDARKISH, M.; DESLYPER, G.; ABDOLLAHI, A.; VALIZADEH, S.; MOLLALO, A.; MAHJOUR, S.; GHODSIAN, S.; ARDEKANI, A.; BEHNIAFAR, H.; GASSER, RB.; ROSTAMI, A. Global prevalence of *Ascaris* infection in humans (2010-2021): a systematic review and meta-analysis. **Infect Dis Poverty**. 18;11(1):113, nov. 2022.

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>.

GARCIA-R, JC.; HAYMAN, DTS. A review and analysis of cryptosporidiosis outbreaks in New Zealand. **Parasitology**. 150(7):606-611, jun. 2023.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. J.; KÖSTER, P. C.; PONCE-GORDO, F. Cyst detection and viability assessment of *Balantioides coli* in environmental samples: Current status and future needs. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 26, p. e00143, mar. 2022.

GERBER, V.; LE GOVIC, Y.; RAMADE, C.; CHEMLA, C.; HAMANE, S.; DESOUBEAUX, G.; DURIEUX, M.F.; DEGEILH, B.; ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A.W.; CANDOLFI, E.; GREIGERT, V.; BRUNET, J. *Ancylostoma ceylanicum* as the second most frequent hookworm species isolated in France in travellers returning from tropical areas. *J. Travel Med.* 28, 2021.

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**, v. 123, n. 3, p. 570-581, 3 jul. 2017.

JANSEN, A. K.; SILVA, K. C.; HENRIQUES, G. S.; COIMBRA, J. DOS R.; RODRIGUES, M. T. G.; RODRIGUES, A. M. DOS S.; GENEROSO, S. DE V. Relato de experiência: terapia nutricional enteral domiciliar – promoção do direito humano à alimentação adequada para portadores de necessidades alimentares especiais. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 9, n. 0, 17 jul. 2014.

JOHNSON, T.W.; MILTON, D.L.; JOHNSON, K.; CARTER, H.; HURT, R.T.; MUNDI, M.S.; EPP, L.; SPURLOCK, A.L. Comparison of Microbial Growth Between Commercial Formula and Blenderized Food for Tube Feeding. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 34, n. 2, p. 257–263, 3 dez. 2018.

JONES, J.L.; KRUSZON-MORAN, D.; RIVERA, H.N.; PRICE, C.; WILKINS, P.P. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in the United States 2009-2010 and comparison with the past two decades. **Am J Trop Med Hyg**, 90:1135–1139, 2014.

JOURDAN, P.M.; LAMBERTON, P.H.L.; FENWICK, A.; ADDISS, D.G. Soil-transmitted helminth infections. **Lancet**, v. 391 (10117), p. 252–265, 20 jan. 2018.

KAME-NGASSE, G. I.; EBOGO-BELOBO, J., THIERRY.; KAMWA-NGASSAM, I.; WATAT, S., V.; ATEMBEH-NOURA, EFIETNGAB.; TCHINDA-TIECHEU, E.; TSAFACK, J.; NKENGAZONG, LUCIA. Parasitological assessment of some fruits and vegetables commonly sold in retail outlets in the Mfoundi Division of Cameroon. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 22, p. e00313–e00313, 1 ago. 2023.

KHAN, W.; RAFIQ, N.; NAWAZ, MA.; KABIR, M.; FAROOQI, ZUR.; ROMMAN, M.; PARVEZ, R.; ALFARRAJ, S.; NOOR, A.; UJJAN, AA. Parasitic contamination of fresh vegetables sold in open markets: a public health threat. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.

KLEINE, A.; JANECEK, E.; WAINDOK, P.; STRUBE, C. Flotation and adherence characteristics of *Toxocara canis* and *T. cati* and a reliable method for recovering *Toxocara* eggs from soil. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 227, p. 35-41, ago. 2016.

KOZOW, JFC.; RABITO, EI.; KRUGER, JF.; MEDEIROS, CO.; DA COSTA, RL.; BEUX, MR.; STANGARLIN-FIORI, L. Microbiological contamination present in enteral tube feeding prepared in hospitals and/or at home: a systematic review. **Nutrition Reviews**, 12 out. 2023.

LACERDA, D., R., N., B.; PAIXÃO FILHO, A., S.; MATOS, A. Contaminação por formas infectantes de enteroparasitas em amostras de alfaces (*lactuca sativa*) comercializadas no espaço urbano de um município do triângulo mineiro. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 71461-71477, 2020.

LE, B.; CLARKE, N.; LEGRAND, N.; NERY., S. Effectiveness of ivermectin mass drug administration in the control of soil-transmitted helminth infections in endemic populations: a systematic review and meta-analysis. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 13, n. 1, 18 fev. 2024.

LEAL, DAG.; GOULART, J.; BONATTI, T.; ARAÚJO, R.; JUNIOR, J.; SHIMADA, M.; GONÇALVES, G.; RORATTO, P.; SCHERER, G. A two-year monitoring of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in freshwater and seawater: A complementary strategy for measuring sanitary patterns of recreational tropical coastal areas from Brazil. **Regional studies in marine science**, v. 70, p. 103356–103356, 1 fev. 2024.

LEAL, DAG.; RAMOS, ANA PAULA, D.; SOUZA, D., S., M.; DURIGAN, M.; GREINERT-GOULART, J., A.; MORESCO, V.; AMSTUTZ, R., C.; MICOLI, A., HEIN.; CANTUSIO, N., R.; BARARDI, C., R., M. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. v. 72, p. 93–100, 1 fev. 2013.

LEAL, DAG.; SOUZA, DSM.; CAUMO, KS.; FONGARO, G.; PANATIERI, LF.; DURIGAN, M.; ROTT, MB.; BARARDI, CRM.; FRANCO, RMB. Genotypic characterization and assessment of infectivity of human waterborne pathogens recovered from oysters and estuarine waters in Brazil. **Water Research**, v. 137, p. 273-280, jun. 2018.

LEUNG, AKC.; LEUNG, AAM.; WONG, AHC.; SERGI, CM.; KAM, JKM. Giardiasis: An Overview. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.**, 13(2):134-143, 2019.

LI, J.; WANG, Z.; KARIM, MR.; ZHANG, L. Detection of human intestinal protozoan parasites in vegetables and fruits: a review. *Parasit Vectors*, 29;13(1):380, jul., 2020.

LIMA, A., R., L., DA COSTA.; BARROS, L., M.; ROSA, M., S.; CARDONHA, A., M., S.; DANTAS, M., A., M. Avaliação microbiológica de dietas enterais manipuladas em um hospital. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 27-30, 2005.

MA, G.; HOLLAND, C., V.; WANG, T.; HOFMANN, A.; FAN, C-K.; MAIZELS, RICK, M.; HOTEZ, Peter J.; GASSER, R., B. Human toxocariasis. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 14-24, jan. 2018.

MA, JY.; LI, MY.; QI, ZZ.; FU, M.; SUN, TF.; ELSHEIKHA, HM.; CONG, W. Waterborne protozoan outbreaks: An update on the global, regional, and national prevalence from 2017 to 2020 and sources of contamination. **Science of The Total Environment**, v. 806, p. 150562, fev. 2022.

MACHADO, ER.; MALDONADE, IR.; RIQUETTE, RFR.; MENDES, VS.; GURGEL-GONÇALVES, R.; GINANI, VC. Frequency of Enteroparasites and Bacteria in the Leafy Vegetables Sold in Brazilian Public Wholesale Markets. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 4, p. 542–548, 7 mar. 2018.

MADDEN, AM.; BAINES, S.; BOTHWELL, S.; CHEN, E.; GOH, S.; JEROME, L.; SOMMARIVA-NAGLE, C.; SZYCHTA, M. A laboratory-based evaluation of tube blocking and microbial risks associated with one blended enteral feed recipe. **Journal of Human Nutrition and Dietetics: The Official Journal of the British Dietetic Association**, v. 32, n. 5, p. 667–675, 1 out. 2019.

MAIA, CMM.; DAMASCENO, KSFDSC.; SEABRA, LMJ.; CHAVES, G.; DANTAS, LMDC.; DE SOUSA, JÚNIOR, FC.; DE ASSIS, CF. Efficacy of sanitization protocols in removing parasites in vegetables: A protocol for a systematic review with meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 17, n. 5, p. e0268258–e0268258, 10 maio 2022.

MALDONADE, I, R.; GINANI, V, C.; RIQUETTEM 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**, 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.

MARCIANO, MAM.; SILVA, RA.; BARBOSA, ML.; PINTO, PL.; DA, S.; GAVA, R.; PEREIRA-CHIOCCOLA, VL. Uso de metodologias laboratoriais para confirmação de surto de doença diarreica aguda causada por múltiplos patógenos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 81:e37253; 2022.

MARQUES, C., S.; SOUSA, S.; CASTRO, A.; FERREIRA, V.; TEIXEIRA, P.; COSTA, J., M., CORREIA DA. Protozoa as the “Underdogs” for Microbiological Quality Evaluation of Fresh Vegetables. *Applied Sciences*, [S.L.], v. 12, n. 14, p. 7145, 15 jul. 2022.

MATOSINHOS, FC.; VALENZUELA, VC.; SILVEIRA, JA.; RABELO, EM. Standardization of a method for the detection of helminth eggs and larvae in lettuce. *Parasitol Res.*, v. 115, n. 5, p. 1827-1834, 2016.

MAZUR, C., E.; SCHMIDT, S., T.; RIGON, S., DO AMARAL.; SCHIEFERDECKER, M., E., M. Terapia Nutricional Enteral Domiciliar: interface entre direito humano à alimentação adequada e segurança alimentar e nutricional. *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, v. 9, n. 3, 29 set. 2014.

MCCORMACK, S.; PATEL, K.; SMITH, C. Blended diet for enteral tube feeding in young people: a systematic review of the benefits and complications. *Journal Of Human Nutrition And Dietetics*, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 1390-1405, 7 fev. 2023.

MILTON, DL.; JOHNSON, TW.; JOHNSON, K.; MURPHY, B.; CARTER, H.; HURT, RT.; MUNDI, MS.; EPP, L.; SPURLOCK, AY.; HUSSEY, J. Accepted Safe Food-Handling Procedures Minimizes Microbial Contamination of Home-Prepared Blenderized Tube-Feeding. *Nutrition in Clinical Practice*, 29 jan. 2020.

MILTON, D.; MURPHY, B.; JOHNSON, TW.; CARTER, H.; SPURLOCK, AY.; HUSSEY, J.; JOHNSON, K. Low risk for microbial contamination of syringe and tube feeding bag surfaces after multiple reuses with home blenderized tube feeding. *Nutrition in Clinical Practice*, 2 mar. 2022.

MOAZEN, M.; RAHMDEL, S.; ABDOLLAHZADEH, SM.; RANJBAR ZAHEDANI M.; MAZLOOMI, SM. Qualidade microbiológica de alimentação enteral comercial usada em dois hospitais públicos em Shiraz, Irã. **J Sistema de Vigilância Científica em Saúde**. 2(2):49-53, 2014.

MORENO-MESONERO, L.; SOLER, L.; MORENO, Y.; FERRÚS, M.A.; ALONSO, J.L. Protozoan parasites and free-living amoebae contamination in organic leafy green vegetables and strawberries from Spain. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 32, p. e00200–e00200, 1 set. 2023.

MURPHY, H., R.; LEE, S.; DA SILVA, A., J. Evaluation of an Improved U.S. Food and Drug Administration Method for the Detection of *Cyclospora cayentanensis* in Produce Using Real-Time PCR. *Journal of Food Protection*, v. 80, n. 7, p. 1133–1144, 7 jun. 2017.

OJO, O.; ADEGBOYE, ARA.; OJO, OO.; WANG, X.; BROOKE, J. The Microbial Quality and Safety of Blenderised Enteral Nutrition Formula: A Systematic Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 24, p. 9563, 21 dez. 2020.

OLADOSU, OO.; OLATUNDE, DO.; OLATAYO, AO.; ATOBATELE, B. Parasitological and Bacteriological Evaluation of Common Raw Fruits Collected from Two Major Markets in Iwo, Osun State, South-West Nigeria. **Int J Food Sci.**, 18;2023:55244992023, may. 2023.

OLIVEIRA, J., P., L.; SILVA, C., F., X., C., DAS.; FERREIRA, L., G.; TEIXEIRA, L., G. Aspectos clínicos de pacientes infanto-juvenis em terapia nutricional enteral domiciliar: uma revisão integrativa. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, n. 2, 2021.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Departamento De Segurança Alimentar, Zoonoses E Doenças De Origem Alimentar. **Five Keys for Safer Food Manual**. Organização Mundial de Saúde, 2006.

OPSTEEGH, M.; CUPERUS, T.; BUUREN, C.; DAM-DEISZ, C.; SOLT-SMITS, C.; VERHAEGEN, B.; JOERES, M.; SCHARES, G.; KOUDELA, B.; EGBERTS, F.; VERKLEIJ, T.; GIESSEN, J.; WISSELINK, H. In vitro assay to determine inactivation of *Toxoplasma gondii* in meat samples. **International journal of food microbiology**, v. 416, p. 110643–110643, 1 maio 2024.

PAHO. Pan American Health Organization. **PANAFTOSA states that foodborne diseases can be avoided with preventive actions along the farm to the table continuum**. PANAFTOSA/SPV-OPAS/OMS: Rio de Janeiro, Brasil, 7 jun. 2022; Disponível em: <https://www.paho.org/en/news/7-6-2022-panaftosa-states-foodborne-diseases-can-be-avoided-preventive-actions-along-farm>. Acesso em: 15nov. 2022.

PAHO. 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: 15nov. 2022.

PEROTE, G., M.; VIEIRA, R., Q.; MEDEIROS, J., L. Nutrição enteral e risco de contaminação microbiológica: uma revisão de literatura. **Nutrivisa – Revista de Nutrição e Vigilância em Saúde**, v. 1, n. 3, p. 23-26, 2014.

PINEDA, C., O.; LEAL, D.A.G.; DE LIMA, R.; RIBEIRO, P., P.; RODRIGUES, A.; MARTINI, M.H.; STANCARI, R., C., A.; MATOSINHOS, F., C., L.; MINÉ, JÚLIO, 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**, v. 14, n. 5, p. 989-996, 6 jan. 2021.

RAFAEL, K.; MARCHIORO, AA.; COLLI, CM.; TIYO, BT.; EVANGELISTA, FF.; BEZAGIO, RC.; FALAVIGNA-GUILHERME, AL. Genotyping of *Giardia duodenalis* in vegetables cultivated with organic and chemical fertilizer from street markets and community vegetable gardens in a region of Southern Brazil. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, 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**, v. 2017, p. 1-8, 2017.

REDMOND, E., C.; GRIFFITH, C., J. Consumer Food Handling in the Home: a review of food safety studies. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 66, n. 1, p. 130-161, jan. 2003.

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

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

ROBERTSON, L. J.; TEMESGEN, T. T.; TYSNES, K. R.; EIKAS, J. E. An apple a day: an outbreak of cryptosporidiosis in Norway associated with self-pressed apple juice. **Epidemiology and Infection**, v. 147, n. 139, p. 1-3, 2019.

RODRIGUES, AC.; DA SILVA, MDC.; PEREIRA, RÂS.; PINTO, LC. Prevalence of contamination by intestinal parasites in vegetables (*Lactuca sativa*L. and *Coriandrum sativum*L.) sold in markets in Belém, northern Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 7, p. 2859–2865, 3 mar. 2020.

RONDELLO, BONATTI, T.; VIDAL, SIQUEIRA-CASTRO, IC.; LEAL, D.A.G.; DURIGAN, M.; PEDROSO, DIAS, RJ.; BUENO, FRANCO, RM. Molecular characterization of waterborne protozoa in surface water and sediment in Brazil: a taxonomic survey of ciliated protozoa and their correlation with *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 195, n. 4, 16 mar. 2023.

ROSTAMI, A.; EBRAHIMI, M.; MEHRAVAR, S.; FALLAH, OMRANI, V.; FALLAHI, S.; BEHNIAFAR, H. Contamination of commonly consumed raw vegetables with soil transmitted helminth eggs in Mazandaran province, northern Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v. 225, p. 54–58, maio 2016.

ROUSSEAU, A.; LA, CARBONA, S.; DUMÈTRE, A.; ROBERTSON, LJ.; GARGALA, G.; ESCOTTE-BINET, S.; FAVENNEC, L.; VILLENA, I.; GÉRARD, C.; AUBERT, D. Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. **Parasite**, v. 25, p. 14, 2018.

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

RYAN, U.; FENG, Y.; FAYER, R.; XIAO, L. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* – a 50 year perspective (1971–2021). **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 13-14, p. 1099–1119, dez. 2021.

SAELEN, G.; ROBERTSON, L.; GABRIËL, S. Diagnostic tools for the detection of taeniid eggs in different environmental matrices: A systematic review. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 26, p. e00145, mar. 2022.

SAFADI, D.; OSMAN, M.; HANNA, A.; HAJAR, I.; KASSEM, II.; KHALIFE, S.; DABBOUSSI, F.; HAMZE, M. Parasitic Contamination of Fresh Leafy Green Vegetables Sold in Northern Lebanon. **Pathogens**, 4;12(8):1014, aug. 2023.

SALAZAR-LLORENTE, E.; MORAIS, M.; SORNOZA, I.; MARIDUENA-ZAVALA, M.; NOU, X.; ORTIZ, J.; MALDONADO-ALVORADO, P.; CEVALLOS-CEVALLOS, J. Microbiological Quality of High-Demand Food from Three Major Cities in Ecuador. **Journal of Food Protection**, v. 84, n. 1, p. 128–138, 1 jan. 2021.

SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. L. (EDS.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. ago. 2015.

SANTIN, M. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 223–238, mar. 2020.

SANTOS, DCD.; ATAIDE, CDG.; MOTA, DA COSTA, N.; OLIVEIRA, JUNIOR, VP.; EGEA, MB. Blenderized formulations in home enteral nutrition: a narrative review about challenges in nutritional security and food safety. **Nutrition Reviews**, v. 80, n. 6, p. 1580–1598, 4 maio 2022.

SCHIEFERDECKER, M. E. M.; GONÇALVES, P.P., A. R.; CRISTINA, L., A.; SANT'ANA, G.G., K.; EURICH, M., C. Programa de atenção nutricional: marco histórico na política pública para pessoas com necessidades alimentares especiais no Município de Curitiba, Paraná. **Demetra**, v. 9, n.1, p. 287-296, 2014.

SCOTT, M. E. *Ascaris lumbricoides*: A Review of Its Epidemiology and Relationship to Other Infections. **Annales Nestlé (English ed.)**, v. 66, n. 1, p. 7–22, 2008.

SENA-LOPES, Â.; REMIÃO, M., H.; ALVES, M., S., D.; FONSECA, B., R.; SEIXAS, F., K.; COLLARES, T.; BORSUK, S. Cell viability analysis of *Toxocara cati* larvae with LIVE / DEAD® Viability/Cytotoxicity kit. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 212, p. 107871, maio 2020.

SILVA, MOREIRA, A. DA.; MARTINS, N. S.; DA MOTTA, S. P.; DOS SANTOS, C. C.; DE MACEDO, M. R. P.; LOPES RUAS, J. POTENCIAL ZOONÓTICO DA GIARDIOSE: UMA REVISÃO / ZOONOTIC POTENTIAL OF GIARDIASIS: A REVIEW. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 79856–79871, 2020.

SHAHNAZI, M.; JAFARI-SABET, M. Prevalence of Parasitic Contamination of Raw Vegetables in Villages of Qazvin Province, Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 9, p. 1025-1030, 2010.

SILVEIRA, J.; ALFREDO, N. A. C.; BEUX, M. R.; FERREIRA, S. M. R.; LEAL, D. A. G. Evaluation of a propolis hydroalcoholic solution with glycine in the joint reduction of microorganisms and helminth eggs from leafy green vegetables. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 26, 1 jan. 2023.

SPECHT, S.; KEISER, J. Helminth infections: Enabling the World Health Organization Road Map. **International Journal for Parasitology**, dez. 2022.

SHIELDS., JM, LEE., MM, MURPHY., HR. Use of a common laboratory glassware detergent improves recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from lettuce, herbs and raspberries. **Int J Food Microbiol.** 1;153(1-2):123-8, fev. 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NUTRIÇÃO PARENTERAL E ENTERAL – SBNPE. **Diretrizes Brasileiras de Terapia Nutricional Enteral.** BRASPEN Journal, v. 33, p. 37-46, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NUTRIÇÃO PARENTERAL E ENTERAL – SBNPE. **Diretrizes em foco - Terapia nutricional domiciliar.** Ver. Assoc. Med. Bras., v. 58, n. 4, p. 408-411, 2012.

SOUSA, L., R., M.; FERREIRA, S., M., R.; SCHIEFERDECKER, M., E., M. Physicochemical and nutritional characteristics of handmade enteral diets. **Nutrición Hospitalaria**, v. 29, n. 3, p. 568-574, 2014.

STRACKE, K.; JEX, A., R.; TRAUB, R., J. Zoonotic Ancylostomiasis: an update of a continually neglected zoonosis. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 103, n. 1, p. 64-68, 8 jul. 2020.

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

TEMESGEN, T., T.; STIGUM, V., M.; ROBERTSON, L., J. Surveillance of berries sold on the Norwegian market for parasite contamination using molecular methods. **Food Microbiology**, v. 104, p. 103980, jun. 2022.

TORGERSON, PR.; DEVLEESSCHAUWER, B.; PRAET, N.; SPEYBROECK, N.; WILLINGHAM, AL.; KASUGA, F.; ROKNI, MB.; ZHOU, XN.; FÈVRE, EM.; SRIPA, B.; GARGOURI, N.; FÜRST, T.; BUDKE, CM.; CARABIN, H.; KIRK, MD.; ANGULO, FJ.; HAVELAAR, A.; DE SILVA, N. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. **PLOS Medicine**, v. 12, n. 12, p. e1001920, 3 dez. 2015.

TRAUB, R., J.; ZENDEJAS-HEREDIA, P., A.; MASSETTI, L.; COLELLA, V. Zoonotic hookworms of dogs and cats – lessons from the past to inform current knowledge and future directions of research. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 51, n. 13-14, p. 1233-1241, dez. 2021.

TRELIS, M.; SÁEZ-DURÁN, S.; PUCHADES, P.; CASTRO, N.; MIQUEL, A.; GOZALBO, M.; FUENTES, MV. Survey of the occurrence of *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in green leafy vegetables marketed in the city of Valencia (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 379, p. 109847, 16 out. 2022.

UNIAT, KC.; STANGARLIN-FIORI, L.; KRÜGER, JF.; SCHIEFERDECKER, MEM.; RABITO, EI. Microbiological quality of enteral formulations handled at home: A systematic review. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 46, n. 8, p. 1787–1796, 27 jul. 2022.

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.

VALENZUELA-MORENO, LF.; RICO-TORRES, CP.; CEDILLO-PELÁEZ, C.; LUNA-PASTÉN, H.; MÉNDEZ-CRUZ, ST.; LARA-MARTÍNEZ, G.; CORREA, D.; CABALLERO-ORTEGA, H. Mixed *Toxoplasma gondii* infection and new genotypes in feral cats of Quintana Roo, México. **Acta Trop**, 193: 199 – 205, 2019.

VANATHY, K.; PARIJA, SC.; MANDAL, J.; HAMIDE, A.; KRISHNAMURTHY, S. Krishnamurthy: Cryptosporidiosis: A mini review. **Trop Parasitol.**, 7(2): 72 – 80, 2017.

VANDERZANT C.; SPLITTSTOESSER F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* Washington (DC): APHA; 2001: 879-978.

VICTORICA, J.; GALVAN, M. Preliminary testing of a rapid coupled methodology for quantification/viability determination of helminth eggs in raw and treated wastewater. **Water Res** 37: 1278–1287, 2003.

VIEIRA, MMC.; SANTOS, VFN.; BOTTONI, A.; MORAIS, TB. Nutritional and microbiological quality of commercial and homemade blenderized whole food enteral diets for home-based enteral nutritional therapy in adults. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 177–181, fev. 2018.

VIEIRA, P., M.; LIMA, C., M.; CRUZ, P., A. Nutrição Enteral: elaboração de um protocolo clínico de tratamento de diarreia em terapia nutricional enteral. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição - Rasbran**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 89-103, 27 jul. 2021.

XAVIER, DE MELO, V.; MEZZOMO, TR.; ARISTIDES, DALL'IGNA, AL.; DE ARAÚJO, M., D., V.; STANGARLIN-FIORI, L.; SCHIEFERDECKER, ME, M.;

RODRIGUES, F., SM. Does the nutritional composition and category of administered enteral nutrition affect the nutritional status of patients receiving home nutritional therapy? **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 49, p. 270–277, jun. 2022.

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

WAINDOK, P.; RAULF, M.-K.; STRUBE, C. Potentials and challenges in the isolation and detection of ascarid eggs in complex environmental matrices. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 28, p. e00174, set. 2022.

WALTCHER, DL.; DE SOUSA, NFGC.; ROCHA, LS.; MATTOS, GT.; KLAFKE, GB.; SCAINI, JLR.; BERNE, MEA.; AVILA, LFC.; SCAINI, CJ. Larvicide Activity Of *Lactobacillus* Spp. And *Saccharomyces Boulardii* Supernatants On *Toxocara Canis*. **J Parasitol.** 1;109(1):15-19, jan. 2023.

WANG, R.; LI, N.; JIANG, W.; GUO, Y.; WANG, X.; JIN, Y.; FENG, Y.; XIAO, L. Infection patterns, clinical significance, and genetic characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Jiangsu, China. **Para-sitol Res** 118(10):3053–3060, 2019.

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, pp. 463–477, 2013.

WANG, ZD.; LIU, HH.; MA, ZX.; MA, HY.; LI, ZY.; YANG, ZB.; ZHU, XQ.; XU, B.; WEI, F.; LIU, Q. *Toxoplasma gondii* Infection in Immunocompromised Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Front Microbiol.**, 8: 389, 2017.

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: 15nov. 2022.

ZAHEDI, A.; FIELD, D.; RYAN, U. Molecular Typing Of *Giardia Duodenalis* In Humans In Queensland - First Report Of Assemblage E. **Parasitology**, 144(9): 1154-61, 2017.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos participantes da pesquisa Qualidade na Nutrição Enteral Domiciliar.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Lize Stangarlin-Fiori, Caroline Opolski Medeiros e Patrícia Audrey Reis Gonçalves Pinheiro, pesquisadoras responsáveis por este estudo, estamos convidando você, manipulador das formulações enterais e cuidador dos pacientes, a participar de um estudo intitulado "Identificação de pontos de controle na manipulação de formulações enterais e proposta de instrumentos para avaliação e orientação das boas práticas em domicílios". Esse estudo é importante para estabelecer os procedimentos de maior risco e que devem ser priorizados durante a manipulação dessas formulações. Além disso, irá contribuir para o aperfeiçoamento de ações de educação sanitária, planejamento de políticas públicas e programas de capacitação capazes de melhorar os critérios higiênicos-sanitários e minimizar os riscos de contaminação desses alimentos fornecidos a pacientes do Sistema Único de Saúde.

- a) O objetivo desta pesquisa é identificar os pontos de controle na manipulação de formulações enterais e propor instrumentos para avaliação e orientação das Boas Práticas em domicílios.
- b) Caso você participe da pesquisa, será necessário que responda dois questionários os quais contêm perguntas sobre seu perfil sociodemográfico e critérios de higiene que adota na manipulação das formulações enterais. Além disso, será necessário coletar uma amostra da superfície e equipamento utilizados na manipulação, do frasco de envase, das suas mãos dos manipuladores, da água utilizada e das formulações prontas para o consumo, para análise microbiológica. Os questionários e a coleta para análise microbiológica serão realizadas durante a visita ao domicílio.
- c) O tempo estimado para que você responda a todas as perguntas da pesquisa e para a coleta para análises microbiológicas é de 40 minutos. A coleta para as análises microbiológicas será realizada nas áreas de manipulação (cozinha e despensa) das formulações enterais no domicílio em período pré-agendado. As avaliações serão conduzidas por um dos pesquisadores durante a visita ao domicílio. Contudo, caso você prefira, poderá responder sozinho(a) o instrumento de pesquisa. Para tanto será agendada uma data para a entrega do instrumento. Neste caso, caso surjam dúvidas o(a) senhor(a) poderá entrar em contato com os(as) pesquisadores(as) desta pesquisa.
- d) Nesta pesquisa não são esperados riscos, uma vez que, está previsto apenas a coleta de dados por meio de questionários. Contudo, um pequeno desconforto ou constrangimento pode ocorrer ao responder sobre o perfil sócio-demográfico, e critérios de higiene durante a manipulação dos alimentos. Caso alguma das situações ocorra, você pode optar por não responder mais aos questionamentos.
- e) Os benefícios esperados com essa pesquisa são a disponibilidade dos principais pontos de controle durante as etapas de preparo das formulações enterais manipuladas em domicílio, no qual irão estabelecer os procedimentos de maior risco e que devem ser priorizados durante a manipulação dessas formulações. Além disso, os resultados do estudo irão contribuir para aperfeiçoamento de ações de educação sanitária, planejamento de políticas públicas e programas de capacitação capazes de melhorar os critérios higiênicos-sanitários e minimizar os riscos de contaminação desses alimentos fornecidos a pacientes do Sistema Único de Saúde.

- f) As pesquisadoras Lize Stangarlin-Fiori, Caroline Opolski Medeiros e Patrícia Audrey Reis Gonçalves Pinheiro, responsáveis por este estudo, poderão ser contatadas no Campus Botânico da Universidade Federal do Paraná, localizado na Av. Lothário Meissner, n° 632, das 08h00min às 17h00min horas (segunda-feira à sexta-feira), pelos telefones (41) 3360-4001, ou pelos e-mails: lizestangarlin@hotmail.com; carolineopolski@ufpr.br; patqoncalves@sms.curitiba.pr.gov.br, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- g) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, Lize Stangarlin-Fiori, Caroline Opolski Medeiros e Patrícia Audrey Reis Gonçalves Pinheiro. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade**.
- h) Você assinará este termo em duas vias, sendo uma do(a) pesquisador(a) e uma para você participante. A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.
- i) O material obtido –questionários– serão utilizados unicamente para essa pesquisa e será destruído/descartado após 5 anos.
- j) As despesas necessárias para a realização da pesquisa, impressão dos questionários, não são de sua responsabilidade e você não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.
- k) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.
- l) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259. O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão colegiado multi e transdisciplinar, independente, que existe nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil e foi criado com o objetivo de proteger os participantes de pesquisa, em sua integridade e dignidade, e assegurar que as pesquisas sejam desenvolvidas dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde).

Eu, _____, li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, ____ de _____ de _____

[Assinatura do Participante de Pesquisa]

[Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE]

Rubricas:

Participante da Pesquisa _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____