



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LETÍCIA SANTOS BALBINO

**PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO SIMPLICADO PARA
RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE *TOXOPLASMA GONDII*
EM HORTALIÇAS FOLHOSAS**

Londrina

2024

LETÍCIA SANTOS BALBINO

**PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO SIMPLIFICADO PARA
RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE *TOXOPLASMA GONDII*
EM HORTALIÇAS FOLHOSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Fernanda Pinto Ferreira

Londrina

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B172p Balbino, Letícia Santos.
Padronização de protocolo simplificado para recuperação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em hortaliças folhosas / Letícia Santos Balbino. - Londrina, 2024.
42 f. : il.

Orientador: Itamar Teodorico Navarro.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Tampão de eluição - Tese. 2. Toxoplasmose - Tese. 3. Vegetais - Tese. 4. Protocolo - Tese. I. Navarro, Itamar Teodorico . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 63

LETÍCIA SANTOS BALBINO

**PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO SIMPLIFICADO PARA
RECUPERAÇÃO DE OOCISTOS DE *TOXOPLASMA GONDII* EM
HORTALIÇAS FOLHOSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Orientador: Prof. Dr. Italmir Teodorico
Navarro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa Dra. Fernanda Pinto Ferreira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa Dra Natalia Gonzaga
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa Dra Juliana Correa Bernardes
Universidade Positivo

Londrina, 28 de maio de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por sempre me guiar no caminho certo, por me dar forças quando pensei que não conseguiria e por colocar pessoas maravilhosas que me ajudaram e auxiliaram durante todo o mestrado.

Agradeço à minha mãe e irmã por sempre terem uma palavra de conforto, por cada abraço quando mais precisei, e por todo amor incondicional. Ao meu noivo por ser meu apoio, por acreditar no meu potencial e ser meu grande incentivador.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro, por todos os ensinamentos e correções e por ser um exemplo de profissional. À Prof^a. Dr^a. Fernanda Pinto Ferreira, por acreditar em mim desde a iniciação científica, me encorajar a continuar, pela paciência e por ser uma “mãe” para mim.

Aos integrantes do grupo de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rafael, Leonardo, Mariana, Julia e Denise, vocês foram fundamentais para realização desse trabalho, muito obrigada por toda ajuda. À técnica do laboratório de protozoologia, Beatriz, e zoonoses, Kerlei, obrigada pelos ensinamentos.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, à Universidade Estadual de Londrina e ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico por me conceder a oportunidade de realizar o mestrado e pela concessão da bolsa.

À banca de qualificação, Prof^a Dr^a Aline Kuhn Sbruzzi Pasquali da Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC, à Prof^a Dr^a Juliane Ribeiro, da Universidade Filadélfia – UNIFIL, obrigada pelas correções e conselhos. Também agradeço à banca de defesa, Prof^a Dr^a Juliana Correa Bernardes, da Universidade Positivo, e à Prof^a Dr^a Natalia Gonzaga da Universidade Estadual de Londrina, por ter aceito o convite e participado dessa etapa final e tão especial.

**"Em seu coração o homem planeja o seu caminho,
mas o Senhor determina os seus passos"**

Provérbios 16:9

Balbino, L.S. **Padronização de protocolo simplificado para recuperação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em hortaliças folhosas**. 2024. 44 p. Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, 2024.

RESUMO

Devido às características nutricionais, as hortaliças são imprescindíveis à alimentação. No entanto, se não higienizadas de forma adequada, podem servir como via de transmissão de parasitoses, como a toxoplasmose. Sua contaminação pode ocorrer durante o processo de cultivo, adubação, irrigação, coleta, transporte, armazenamento e comercialização. Os oocistos de *Toxoplasma gondii* são eliminados por felídeos no ambiente, contaminando água e vegetais. Até o momento, não há relato de técnica simplificada e validada para uso em laboratórios. Esse trabalho teve como objetivo padronizar uma metodologia de recuperação de oocistos de *T. gondii* de hortaliças folhosas. Para a padronização da técnica, foi inoculado 1000 oocistos/mL *T. gondii* para cada 50g de alface crespa, utilizou-se como soluções extratoras água destilada, salina (NaCl 0,085%), Tween 80 (0,1%), Glicina 1M e Dodecil sulfato de sódio (SDS 0,1%); quanto a homogeneização, realizada de forma mecânica, por agitador de mesa, mixer, ou então de forma manual; também avaliou-se o uso de filtração por gaze; e por fim rotações de centrifugação a 1500 xg e 2100 xg/10min, totalizando 60 protocolos diferentes, em triplicata. Para quantificação e avaliação da eficiência, o DNA das amostras foi extraído por kit comercial e posteriormente realizado qPCR e, PCR para análise da sensibilidade. O protocolo com melhor desempenho foi com o uso da glicina 1M como tampão de eluição, homogeneização manual, ausência de filtração em gaze e centrifugação a 2.100 xg. Com este estudo foi possível determinar um método prático e simplificado para a detecção de DNA de *T. gondii* em amostras de hortaliças folhosas.

Palavras-chave: Tampão de eluição; Toxoplasmose; Vegetais; Protocolo; Viabilidade.

Balbino, L.S. **Standardization of a simplified protocol for recovering *Toxoplasma gondii* oocysts from leafy vegetables**. 2024. 44 p. Dissertation presented to the Postgraduate Program in Animal Science, State University of Londrina, as a partial requirement for obtaining a Master's degree, 2024.

ABSTRACT

Due to their nutritional characteristics, vegetables are essential to the diet. However, if they are not properly sanitized, they can serve as a means of transmitting parasites such as toxoplasmosis. Contamination can occur during the cultivation process, fertilization, irrigation, collection, transport, storage and marketing. *Toxoplasma gondii* oocysts are shed by felids into the environment, contaminating water and plants. To date, there is no simplified and validated technique for use in laboratories. The aim of this study was to standardize a methodology for recovering *T. gondii* oocysts from leafy vegetables. To standardize the technique, 1000 oocysts/mL *T. gondii* oocysts/mL was inoculated into each 50g of curly lettuce. Distilled water, saline (NaCl 0.085%), Tween 80 (0.1%), Glycine 1M and Sodium Dodecyl Sulphate (SDS 0.1%) were used as extractant solutions; manual and mechanical agitation was used for homogenization; the use of gauze filtration was also evaluated; and finally centrifugation rotations at 1500 x g and 2100 x g/10min, totaling 60 different protocols, in triplicate. For quantification and efficiency evaluation, DNA from the samples was extracted using a commercial kit and then qPCR and PCR were carried out for sensitivity analysis. The protocol with the best performance was the use of 1M glycine as the elution buffer, manual homogenization, no gauze filtration and centrifugation at 2,100 xg. With this study it was possible to determine a practical and simplified method for detecting *T. gondii* DNA in leafy vegetable samples.

Keywords: Elution buffer; Toxoplasmosis; Vegetables; Protocol; Viability

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Taquizoítos em fluido corpóreo (A), cisto tecidual em tecido neural (B), oocisto esporulado contendo dois esporocistos com quatro esporozoíto (C).....14

Figura 2 - Oocistos não esporulados de *T.gondii* em flutuação fecal.....15

Figura 3 - Distribuição de surtos e número de pessoas acometidas por toxoplasmose no Brasil entre os anos de 1965 e 2019.....18

Tabela 1 - Amostras positivas para *Toxoplasma gondii* em hortaliças em estudos realizados a campo, no mundo.....21

Tabela 2 - Análises moleculares realizadas em amostras provenientes de pesquisa a campo.....24

ARTIGO

Figura 1 - Esquema empregado para padronização do método de recuperação de *Toxoplasma gondii* em hortaliças. Pés de alface utilizados para coleta de amostras (01), amostras higienizadas e secas (02), separação de amostras de 50g (03), inoculação com 1ml de água ultrapura contendo 1.000 oocistos de *T.gondii* em cada amostra pesada (04), armazenamento sob refrigeração a 4°C/48 horas (05), amostras contaminadas homogeneizadas com 200 mL de solução de lavagem de acordo com sua identificação (06), realização da agitação manual, mecânica durante cinco minutos em saco plástico, ou trituração em Becker com auxílio de mixer, até que as amostras tornassem líquidas, respectivamente (07), cada solução distribuída em quatro tubos de centrifugação de fundo cônico de 50 mL (08), utilizando, ou não, gaze dupla para filtração das folhas previamente (09), dupla centrifugação durante 10 minutos testando as velocidades de rotação de 1500 xg ou 2100 xg (10), pellets armazenados em microtubo de 1,5 mL à -20°C até a extração de DNA (11).....33

Figura 2 - Fluxograma das análises realizadas com alfaces crespas para padronização do método.....35

Tabela 1 - Comparação da repetibilidade, número de cópias amplificadas e desvio padrão, entre os tampões de eluição, água, Tween 80 e glicina, que apresentaram maior porcentagem de amplificação.....38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR	Reação em cadeia da polimerase
q-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
IMS	Separação imunomagnética
DNA	Ácido desoxirribonucleico
SDS	Docecil sulfato de sódio
HCl	Ácido clorídrico
NaCl	Cloreto de sódio
µl	Microlitros
M	Molar
xg	Força centrífuga relativa
g	Gramas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1. Toxoplasma gondii: Características e epidemiologia	13
2.1.1. Ciclo de vida	13
2.1.2. Características das Formas de Desenvolvimento	14
2.2. Contaminação em hortaliças	16
2.3. Epidemiologia da infecção por Toxoplasma gondii em humanos	17
2.3.1. Grupos de Risco e Consequências Clínicas	17
2.3.2. Perfil Epidemiológico dos Surtos e Contaminação de Vegetais	18
2.4. Métodos de detecção e recuperação de Toxoplasma gondii em hortaliças	22
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
4. HIPÓTESE	29
5. OBJETIVOS	29
5.1. Objetivo geral	29
5.2. Objetivo específico	29
6. ARTIGO	30
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose afeta todos os animais de sangue quente (Dubey; Lin, 1994), considerados hospedeiros intermediários, capazes de albergar cistos teciduais por toda a vida. Os felídeos, enquanto hospedeiros definitivos, eliminam os oocistos nas fezes, podendo permanecer viáveis por meses ou anos no ambiente (Dubey e Frenkel, 1972), contaminando a água, utilizada para consumo ou irrigação, e hortaliças folhosas, que se consumidas cruas podem servir como importante meio de transmissão (Ferreira *et al.*, 2018).

Estima-se que um terço da população mundial sofra de doenças relacionadas à ingestão de alimentos contaminados. Entre os parasitos transmitidos por alimentos, o *Toxoplasma gondii*, é comumente descrito como causador de surtos de origem alimentar e hídrica, sendo um importante problema de saúde pública e gerando um impacto econômico significativo (FAO, 2012). Cerca de 50,0 a 80,0% da população brasileira possuem anticorpos contra *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2012), variando conforme os hábitos e regiões (Tenter; Heckeroth; Weiss, 2000). Usualmente a infecção é assintomática em imunocompetentes, diferente dos imunocomprometidos no qual tende a ser mais grave, podendo manifestar linfadenopatia, febre, enxaqueca, doenças oculares ou mialgia (Hollimax, 1993; Bowie *et al.*, 1997).

Dentre os inúmeros surtos de toxoplasmose registrados no Brasil, na maioria, a via de transmissão não foi totalmente definida, contudo, as hortaliças foram identificadas, como principais suspeitas, após investigação epidemiológica (Balbino *et al.*, 2021).

Na cidade de Londrina, Paraná, Brasil, ocorreram dois surtos envolvendo alimentos, embora a presença do parasito não tenha sido detectada em nenhum material analisado, devido ao atraso da notificação do surto e ausência de técnica padronizada para a análise, os resultados epidemiológicos apontaram associação estatística com o consumo de hortaliças (Cabral *et al.*, 2020; Pinto-Ferreira *et al.*, 2019).

Diante dos inúmeros benefícios das hortaliças, o crescente consumo pela população mundial, potencial risco de contaminação e veiculação de *T. gondii*, bem como dificuldade de recuperação, isolamento e identificação do agente em surtos. É

1 evidente a necessidade de estudos mais específicos, comparativos para a
2 padronização de técnicas de recuperação de oocistos de *T. gondii* de fácil aplicação
3 aplicação em laboratórios com infraestrutura de diagnóstico molecular.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1 2. REFERENCIAL TEÓRICO

2 2.1. *Toxoplasma gondii*: Características e epidemiologia

3 2.1.1. Ciclo de vida

4

5 *Toxoplasma gondii* é um coccídeo de ciclo de vida heteroxeno. Nos
6 hospedeiros intermediários ocorre a fase assexuada, na fase aguda, há formação dos
7 taquizoítos, que sofrem uma rápida multiplicação por endodiogenia nas diversas
8 células hospedeiras e são liberados na corrente sanguínea para invasão de novas
9 células. Em seguida fazem a diferenciação de taquizoítos e bradizoítos uma vez que
10 favorecidos por fatores como pressão do sistema imune e estresse ambiental,
11 formando os cistos teciduais, estes possuem elevada afinidade por tecidos neurais e
12 musculares e, podem permanecer quiescente no hospedeiro intermediário por toda
13 vida. Além de serem a fase terminal do ciclo de vida nestes hospedeiros (Dubey;
14 Beattie, 1988; Evans, 1992). Embora possuam um metabolismo lento, podem romper
15 o cisto, se transformando novamente em taquizoítos, promovendo novas invasões
16 celulares (Frenkel, 1997; Tenter; Heckeroth; Weiss, 2000).

17 Nos hospedeiros definitivos, felídeos silvestres e domésticos, ocorre a fase
18 sexuada. Ao ingerirem cistos teciduais, por meio do carnivorismo, os bradizoítos em
19 seu interior, serão liberados e iniciarão a multiplicação no epitélio intestinal, no qual
20 haverá a formação de oocistos não esporulados e não infectivos, que serão eliminados
21 nas fezes. Estes oocistos no ambiente passam por um processo de esporogonia, e
22 que, ocorrerá a esporulação entre um a cinco dias, sob temperatura, oxigenação e
23 umidade adequadas, tornando-se altamente infectantes para animais de sangue
24 quente e o homem (Dubey; Frenkel, 1972; Tenter; Heckeroth; Weiss, 2000), em
25 contrapartida, a esporulação pode ser retardada em condições de microaerofilia. Os
26 felídeos, silvestres e domésticos, são os únicos hospedeiros definitivos capazes de
27 eliminar milhões de oocistos, forma resistente do *T. gondii* (Dubey; Christie; Pappas,
28 1977).

29

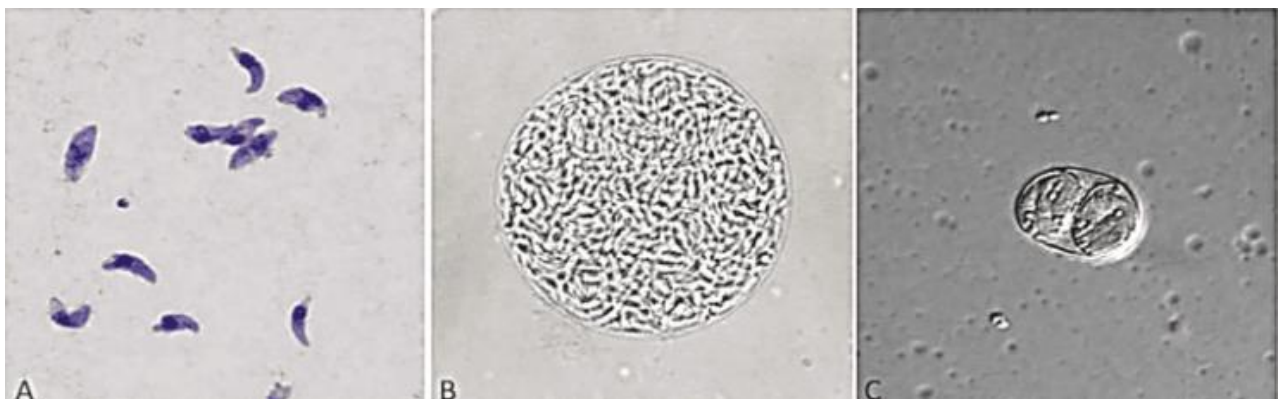
1 2.1.2 Características das Formas de Desenvolvimento

2

3 O taquizoíto (Figura 1) apresenta papel fundamental na transmissão vertical, e
4 já foi identificado em órgãos como: coração, rim, fígado, medula óssea, sangue e leite
5 de cabra (Dubey; Beattie, 1988; Evans, 1992). Essa forma é sensível aos fatores
6 externos, dependendo da temperatura e do pH, além de também serem sensíveis às
7 enzimas proteolíticas e, inativados pela pasteurização ou fervura, no entanto, podem
8 ser resistentes no processamento do queijo fresco com leite de cabra (Dubey et al.,
9 2014).

10

11 **Figura 1** - Taquizoítos em fluido corpóreo (A), cisto tecidual em tecido neural (B),
12 oocisto esporulado contendo dois esporocistos com quatro esporozoíto (C).



13

14 Fonte: Adaptado de Weiss e Kim (2007)

15

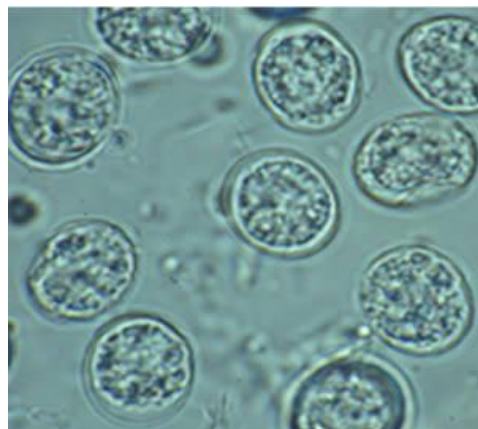
16 O cisto tecidual (Figura 1) possui como característica fundamental a presença
17 de bradizoítos em seu interior e é envolto por uma cápsula, isolando o parasito da
18 ação do sistema imunológico (Dubey; Frenkel, 1972), essa característica confere
19 resistência por meses, anos ou durante toda a vida do hospedeiro. Sabe-se que os
20 cistos teciduais são mais resistentes à ação de enzimas digestivas quando
21 comparados aos taquizoítas, porém são menos resistentes às condições ambientais
22 comparado aos oocistos. Estudos comprovaram que os cistos são resistentes às
23 mudanças de temperatura, permanecendo infeccioso em carcaças sob refrigeração,
24 de 1 à 4°C, por mais de três semanas (Dubey et al., 1990).

1 Também sobrevivem ao congelamento entre -1 e -8°C, por mais de uma
2 semana (Kotula et al., 1991). O cozimento nem sempre inativa o cisto, exigindo uma
3 temperatura de 67°C para garantir a eficácia. No entanto, os cistos mostram-se pouco
4 resistentes ao calor quando estão fora do hospedeiro (Dubey et al., 1990).

5 A terceira forma são os oocistos (Figura 2), que apresentam uma forma
6 esférica, contendo dois esporocistos e quatro esporozoítos, além de uma parede
7 dupla. Essa característica confere resistência ambiental, já que são impermeáveis e,
8 consequentemente, resistem à ação de desinfetantes. (Dubey; Beattie, 1988; Evans,
9 1992). Sobrevivem por curtos períodos em temperatura fria e desidratação,
10 permanecendo infectante em solo úmido ou areia por mais de 18 meses.

11 Sob temperatura controlada, foi observado que o oocisto esporulado
12 permaneceu viável por 54 meses quando estocado a 4°C, ou congelado a -10°C por
13 106 dias (Dubey, 1998). Os oocistos podem ser distribuídos no ambiente pelo vento,
14 chuva, água, alimentos, minhocas, vertebrados coprófagos e esterco (Dubey; Beattie,
15 1988). Atualmente, verduras, frutas ou água contaminada com oocistos estão entre
16 as principais vias de transmissão causadoras de surtos (Dubey et al., 2012; Frenkel,
17 1997; Tenter; Heckerth; Weiss, 2000).

18
19 **Figura 2** - Oocistos não esporulados de *T.gondii* em flutuação fecal.



20
21 Fonte: cdc.gov/dpdx

22

2.2. Contaminação em hortaliças

As práticas atuais da indústria para monitorar a qualidade microbiana se concentram em indicadores bacterianos, que são pouco correlacionados com a presença de diversas classes de patógenos, ou dependem da detecção de patógenos bacterianos específicos como *Salmonella* e *Listeria*, após o cultivo, para determinar a segurança dos alimentos. Os protozoários patogênicos, por outro lado, raramente são testados em produtos frescos. Quando se trata de contaminação por alimentos, protozoários e helmintos são preocupantes para a saúde pública (Matosinhos, 2012).

Nos últimos 20 anos, houve um aumento no consumo de alimentos mais saudáveis e de baixo teor calórico (Bernal et al., 2017), levando em conta a longa persistência do oocisto de *T. gondii* no ambiente, a baixa quantidade de oocistos necessários para a infecção em humanos e, mais relatos de surtos ligados à oocistos em vegetais, a contaminação em produtos frescos se torna cada vez mais importante (Caradonna et al., 2017; Dixon, 2016).

As fontes de contaminação de vegetais e hortaliças cruas durante a plantação e cultivo incluem a utilização de fertilizante sem compostagem prévia adequada, como forma de substituição dos fertilizantes químicos (Mariwah; Drangert, 2011); águas residuais não tratadas para irrigação, comum em países em desenvolvimento e áreas urbanas (Scott; Faruqui; Raschid-Sally, 2004); aproximação de felídeos no local de cultivo levando a exposição das suas fezes (Khan et al., 2021); que podem conter os oocistos de *T. gondii*; além do transporte ou manuseio das hortaliças nos locais de venda sob condições desfavoráveis.

Após a colheita, garantir procedimentos higiênicos adequados nos serviços alimentares é crucial para manter a segurança dos alimentos, tanto nas hortas quanto em feiras e mercados. Cardoso et al., (2020) observaram que em feiras a ocorrência de contaminação era maior quando comparada ao mercado, possivelmente pela exposição inadequada dos produtos, presença de animais, temperatura e falta de higiene durante o manuseio dos alimentos.

O processo de lavagem, muitas vezes, não é efetivo na descontaminação devido à estrutura irregular e com múltiplas folhas, que facilita a fixação do parasito

1 (Falavigna et al., 2005), e vale salientar que a imersão em hipoclorito a 5,25%, ou
2 ácido acético não é eficaz para destruição do oocisto (Wainwright et al., 2007).

3 **2.3. Epidemiologia da infecção por *Toxoplasma gondii* em humanos**

4 5 2.3.1 Grupos de Risco e Consequências Clínicas

6
7 Em relação às manifestações clínicas, a maioria dos infectados, cerca de
8 90,0%, são assintomáticos (Moura, 2016). Em uma pequena porção de indivíduos há
9 relatos de doenças oculares ou neurológicas, no entanto, a doença pode ocasionar
10 sérias consequências em dois grupos particulares: pacientes imunodeprimidos,
11 podendo causar encefalite devido, principalmente, a reativação de cistos cerebrais e,
12 especialmente, em mulheres que adquiriram a infecção pela primeira vez, durante a
13 gestação, comprometendo o feto em graus diferentes, dependendo do período
14 gestacional e da resposta imunológica da mãe (Varella, 2007; (Mitsuka-Breganó;
15 Lopes-Mori; Navarro, 2010).

16 Quando ocorre a infecção no primeiro trimestre de gestação, o resultado é,
17 geralmente, morte fetal. Já no segundo e terceiro trimestre de gestação as
18 consequências são diversas, como: hidrocefalia, necrose periventricular com macro
19 ou microcefalia, destruição da retina, retinocoroidite, calcificação cerebral e retardo
20 mental associado à encefalite e a convulsões. Entretanto, a maioria dos recém-
21 nascidos são assintomáticos, podendo manifestar as alterações clínicas ao longo da
22 vida. Estima-se que mais de 85,0% desenvolvem problemas oculares na infância ou
23 adolescência e 40,0% manifestam sequelas neurológicas (Mitsuka-Breganó; Lopes-
24 Mori; Navarro, 2010).

25 Devido às graves consequências provocadas pelo parasito, o diagnóstico
26 precoce é primordial para evitá-las, pois irá impactar na qualidade de vida dos
27 indivíduos, além de perdas econômicas e sociais para o país (Moura, 2016).

28

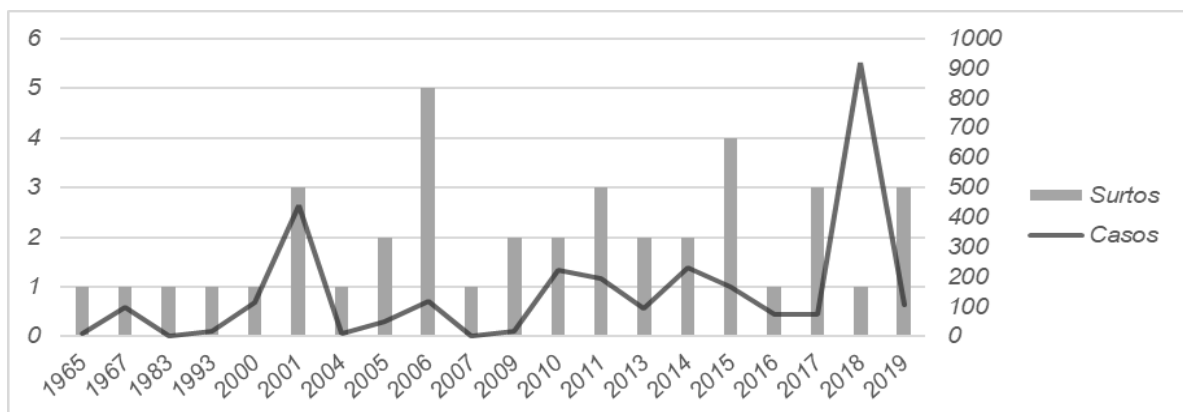
29

2.3.2. Perfil Epidemiológico dos Surto e Contaminação de Vegetais

Com relação aos surtos de toxoplasmose, manifestações clínicas precoces ocorrem principalmente em pacientes após ingestão de carne contendo cistos, porém, a forma biológica mais relatada e que afeta um grande número de pessoas, são os oocistos presentes na água e vegetais (Meireles et al., 2015; Pinto-Ferreira et al., 2019).

Uma revisão sistemática realizada por Balbino et al. (2021), abordando surtos de toxoplasmose do Brasil, em associação com dados coletadas, sobre o tema, junto às secretarias de saúde, observaram frequência de 61,9% (26/42) envolvendo oocistos, sendo que 23,8% (10/42) dos relatos teve como vias de transmissão frutas e verduras, como no caso do Paraná que relatou três surtos devido a contaminação de vegetais. (Figura 1). Além disso, observaram uma mudança no perfil dos surtos, nas décadas de 1960 e 1990 os surtos ocorreram principalmente pela ingestão de cistos em carne e derivados, em 1980 foi por meio de leite contaminado com taquizoítos e na de 2000 devido a presença de oocistos em água e ao contato com fezes de felinos. Porém, a partir de 2010 houve um aumento na incidência de surtos por ingestão de oocistos em vegetais cru. Ao todo foram 3.217 indivíduos acometidos pela doença durante os anos de 1965 a 2019, demonstrando a importância do diagnóstico do parasito (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição de surtos e número de pessoas acometidas por toxoplasmose no Brasil entre os anos de 1965 e 2019.



Fonte: Balbino et al., (2021).

1 Ao que se refere às frutas, o Ministério da Saúde fiscalizou um evento que
2 ocorreu em 2011 no município de Ji-Paraná, Rondônia, e constatou que 141
3 indivíduos tiveram toxoplasmose aguda por ingestão de polpa de açaí contendo
4 ocistos de *T. gondii* (Dutra et al., 2012). O açaí, em 2013, também foi o alimento
5 determinante de um surto no município de Ponta de Pedras, estado do Pará,
6 envolvendo 73 pessoas que consumiram açaí não pasteurizado contendo ocistos,
7 esses surtos serviram para evidenciar essa fruta como importante via de transmissão
8 da toxoplasmose (Morais et al., 2016).

9 Em 2009, um estudo caso-controle englobando 11 casos de toxoplasmose
10 aguda em uma fábrica no Estado de São Paulo, Brasil, foi feita uma investigação
11 abrangendo todos os alimentos consumidos nas três semanas correspondentes ao
12 período de exposição, ao final da investigação identificaram que somente a escarola
13 foi associada ao surto (Ekman et al., 2012).

14 Em 2016, ocorreu um surto no município de Londrina envolvendo 73 pessoas
15 positivas para o parasito, foi realizado um estudo epidemiológico para identificar a via
16 de transmissão. Durante a investigação, foram observadas várias condições que
17 poderiam ter contribuído para o surto, incluindo cisternas com rachaduras, presença
18 de ninhadas de gatos próximas ao restaurante, e práticas inadequadas de
19 higienização e processamento de alimentos. A correlação dessas irregularidades com
20 o hábito alimentar de consumir vegetais crus levou à suspeita de que o surto foi
21 causado pela ingestão de verduras servidas no restaurante da empresa (Cabral *et al.*,
22 2020). No mesmo ano e cidade, 20 pessoas, em outra instituição de pesquisa também
23 tiveram a doença aguda após ingestão de vegetais do restaurante da empresa (Pinto-
24 Ferreira *et al.*, 2019).

25 A contaminação de vegetais não é restrito a surtos, vários estudos descrevem
26 a presença de *T.gondii* em hortaliças oriundas de feiras, hortas e mercados. Ainda
27 que baixa prevalência quando comparado aos demais parasitos, se mostrou presente
28 na maioria das pesquisas, variando de 1,0% a 8,0% (Istifanus; Panda, 2018;
29 Mohammed; Kadhim; Ali, 2019).

30 No noroeste do Paraná, Brasil, Marchioro et al., (2016) realizaram um estudo
31 em que foram coletadas 238 amostras de diferentes hortaliças, identificaram DNA de
32 *T. gondii* em 20,0% (1/5) de salsinha, 14,3% (1/7) de rúcula, 5,0% (2/40) de chicória,

1 3,7% (4/106) de alface crespa e 0,6% (1/62) de alface lisa. Esses vegetais eram
2 provenientes de hortas comunitárias e feiras com produções orgânicas e
3 convencionais, e vendidas em mercados pelos próprios produtores. Os autores
4 relataram que, os vegetais podem ser contaminados em qualquer uma das etapas de
5 manejo, produção e comércio, uma vez que mesmo em vegetal proveniente de cultivo
6 hidropônico, sem contato com o solo e irrigação sem pulverização nas folhas, houve
7 detecção de *T. gondii*, possivelmente, pela manipulação pós colheita.

8 Lass et al. (2012), relataram a detecção de DNA do parasito em 9,7% (21/216)
9 das amostras, por reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR), de frutas
10 e hortaliças coletadas em pequenos e grandes mercados e hortas na Polônia. A
11 análise dos dados revelou que as condições de higiene não foram o fator determinante
12 para as amostras positivas. Segundo os pesquisadores, a baixa positividade das
13 amostras pode ter sido também pelas limitações relacionadas ao método escolhido
14 para recuperação, onde vários oocistos podem ter sido perdidos, assim como na
15 escolha do método de extração do DNA.

16 Berrouch et al., (2020) conduziram uma pesquisa sobre protozoários
17 potencialmente transmitidos para humanos através de água contaminada, hortaliças
18 frescas e outros alimentos. No estudo, identificaram 16,6% (22/132) das amostras
19 contaminadas por *T. gondii* e, demonstraram que vegetais de folhas verdes são mais
20 suscetíveis do que legumes de raízes, possivelmente devido à ampla área de
21 superfície das folhas, que facilita a contaminação direta pelo contato com solo e água
22 contaminada. A estrutura da superfície também influencia, os vegetais de superfícies
23 rugosas são mais propensos à contaminação do que os de superfícies lisas, como
24 rabanete e cenoura. Outros estudos foram realizados com o objetivo de identificar
25 protozoários, incluindo *T. gondii*, em amostras de hortaliças (Tabela 1).

26

27

28

29

- 1 **Tabela 1** - Amostras positivas para *Toxoplasma gondii* em hortaliças em estudos
 2 realizados a campo, no mundo.

Tipo de amostra	Quantidade coletada	Número de amostras positivas n (%)	Referência
Rabanete	60	3 (5,0%)	Lass et al., 2011
Cenoura	46	9 (19,5%)	
Alface	50	9 (18,0%)	
Espinafre	387	3 (0,78%)	Lalonde et al., 2015
Alface lisa	62	1 (0,6%)	Marchioro et al., 2016
Alface crespa	106	4 (3,7%)	
Chicória	40	2 (5,0%)	
Rúcula	7	1 (14,3%)	
Salsinha	5	1 (20,0%)	
Alface	30	1 (0,3%)	Pinto-Ferreira et al., 2020
Cenoura	30	3 (10,0%)	Berrouch et al., 2020
Coentro	29	3 (10,3%)	
Alface	28	2 (7,14%)	
Salsinha	29	13 (44,0%)	
Rabanete	16	1 (6,25%)	
Menta	50	5 (10,0%)	Dardona et al., 2021
Endro	50	4 (8,0%)	
Agrião	50	4 (8,0%)	
Salsa	50	3 (6,0%)	
Tomilho	50	2 (4,0%)	
Alface	50	1 (2,0%)	

1 **2.4. Métodos de detecção e recuperação de *Toxoplasma gondii* em hortaliças**

2 Existem métodos padronizados para outros protozoários como *Giardia* spp e
3 *Cryptosporidium* spp descritas no ISO 18744:2016, porém nenhum específico e
4 sensível para a detecção de oocistos de *T. gondii* em vegetais (Lass et al., 2012). Os
5 métodos experimentais descritos na literatura geralmente começam com a utilização
6 de tampões de eluição, como glicina, solução à base de dodecil sulfato de sódio (SDS)
7 e Tween 80, para a remoção dos oocistos das superfícies folhosas. Em seguida, os
8 oocistos são agitados manualmente ou mecanicamente por um período específico e,
9 posteriormente, centrifugados para separá-los dos resíduos remanescentes. Em
10 alguns casos, a filtração também é realizada para auxiliar na etapa anterior. Por fim,
11 a análise molecular é utilizada para identificação do protozoário.

12 Chandra; Torres; Ortega (2014) avaliaram amostras de manjeriço (25g), no
13 qual inocularam 100 oocistos na superfície das folhas. No estudo, foram testadas seis
14 soluções diferentes: água ultrapura, 3% de ácido levulínico com 3% SDS, glicina 1M,
15 PBS 0,1%, Alconox® 0,1% e HCl-pepsina 1%. Para a recuperação dos oocistos,
16 empregaram técnicas como homogeneização manual, seguida de concentração por
17 centrifugação e, a análise das amostras foi realizada utilizando nested-PCR e
18 microscopia. Entretanto, ressaltaram que o HCl-pepsina a 1% demonstrou uma
19 variabilidade menor na recuperação de oocistos. Apesar desse resultado, os
20 pesquisadores ressaltam que outras soluções podem apresentar melhor desempenho
21 em diferentes circunstâncias. Eles sugerem que, em alimentos que contenham
22 gorduras ou lipídios, é preferível utilizar soluções de lavagem que possuam
23 propriedades detergentes, como é o caso do Alconox®.

24 Hohweyer et al., (2016) realizaram uma análise em 30g de amostras de
25 manjeriço e framboesa em busca de diversos parasitos, incluindo o *T. gondii*. Para a
26 recuperação dos parasitos, utilizaram mesa de agitação e *stomacher*, empregando
27 tampão de glicina 1 M como solução extratora. Os resultados mostraram que 95% das
28 amostras positivas foram detectadas, com um desempenho ainda melhor quando
29 associado à separação imunomagnética (IMS) e qPCR. Esses dados sugerem que
30 cada matriz alimentar possui características específicas que podem interferir na
31 extração/eluição de protozoários, como aprisionamento e força de adesão, bem como
32 na detecção por qPCR, devido à presença de possíveis inibidores, e sugerem,

1 portanto, que pode ser necessário implementar diferentes métodos dependendo do
2 parasito em questão.

3 Enquanto De Souza et al., (2016), utilizaram morangos e a contaminação se
4 deu pelo método de imersão em água contendo oocistos. Para recuperação foi
5 realizada homogeneização com a solução extratora Tween 80 1%, seguido de filtração
6 em celulose, lavagem da membrana com Tween 80 0,1% para eluição, concentração
7 por centrifugação. E por último foi realizada a análise molecular por meio da PCR, na
8 qual observaram que foi possível recuperar os oocistos em todas as amostras
9 contaminadas.

10 Kim et al., (2021) e Shapiro et al., (2019) também utilizaram o detergente Tween
11 80 0,1% como solução extratora, utilizando o método de homogeneização manual e
12 concentração por centrifugação, ambos obtiveram adequada recuperação dos
13 oocistos em suas análises.

14 Quanto à análise das amostras recuperadas, usualmente utiliza-se a
15 amplificação do DNA por meio da PCR em pesquisas a campo (Tabela 2). Em estudos
16 experimentais também é utilizado a separação imunomagnética (IMS), q-PCR,
17 bioensaio, microscopia, dentre outros, independentemente do método é
18 imprescindível a recuperação eficiente de oocistos.

19

20

21

22

23

24

25

1 **Tabela 2** - Análises moleculares realizadas em amostras provenientes de pesquisa a
 2 campo.

País	Método de análise	Número de amostras testadas	Número de amostras positivas	Referência
Itália	qPCR	648	5	Caradonna et al., 2017
Brasil	PCR	62	1	Marchioro et al., 2016
Canadá	qPCR	1171	3	De Souza et al., 2016
Polônia	qPCR	50	9	Lass et al., 2012
EUA	RT-PCR	62	12	Lily et al., 2021
República Tcheca	qPCR triplex	90	8	Slany et al., 2019
Marrocos	qPCR	28	2	Berrouch et al., 2020

3

4 Métodos microscópicos para determinação taxonômica de oocistos são
 5 limitados devido a semelhança entre os oocistos quando não esporulados e a
 6 necessidade de um parasitologista experiente para distinção dos oocistos fecais
 7 (Gajadhar et al., 2015; Mansfield; Gajadhar, 2004). Apesar de existirem kits
 8 comercialmente disponíveis para a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* por meio
 9 de separação imunomagnética (IMS) e imunofluorescência indireta (IFA), não há
 10 disponibilidade semelhante para *Cyclospora* ou *Toxoplasma* (Lalonde; Gajadhar,
 11 2016).

12 A técnica de qPCR com análise de curva de melting está disponível para
 13 diversos protozoários da subclasse coccidia presentes em alimentos, amostras
 14 clínicas e ambientais, porém, ainda não foi validada para uso específico em hortaliças
 15 (Lalonde; Gajadhar, 2011). É necessário haver um método validado, uma vez que as
 16 folhas verdes prontas para consumo apresentam propriedades físicas e bioquímicas
 17 que dificultam a remoção e detecção de oocistos. Suas folhas geralmente contêm
 18 fenóis, polissacarídeos, pectina e outros componentes que podem inibir a PCR,

1 diminuindo a sensibilidade das análises moleculares (Schrader et al., 2012). Por esses
2 motivos, são necessárias modificações nos métodos para se adequarem a folhagem,
3 além de garantir sua integridade física, pois condições inadequadas, como folhas
4 apodrecidas, murchas, congeladas, mofadas ou em decomposição, podem
5 comprometer os resultados. Além disso, essas condições podem liberar inibidores da
6 PCR, afetando a sensibilidade e precisão das análises (Li et al., 2020).

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALBINO, L. S. et al. Epidemiological study of toxoplasmosis outbreaks in Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, n. June, p. 1–8, 2021.
- BERNAL, R. T. I. et al. Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel): mudança na metodologia de ponderação. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 26, n. 4, p. 701–712, 1 out. 2017.
- BERROUCH, S. et al. Cryptosporidium spp., Giardia duodenalis and Toxoplasma gondii detection in fresh vegetables consumed in Marrakech, Morocco. **African health sciences**, v. 20, n. 4, p. 1669–1678, dez. 2020.
- BOWIE, W. R. et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **Lancet**, v. 350, n. 9072, p. 173–177, 19 jul. 1997.
- CABRAL MONICA, T. et al. Epidemiology of a toxoplasmosis outbreak in a research institution in northern Paraná, Brazil. **Zoonoses and public health**, v. 67, n. 7, p. 760–764, nov. 2020.
- CARADONNA, T. et al. Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. **Food Microbiology**, v. 67, p. 67–75, 2017.
- 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, 2014.
- DE SOUZA, C. Z. et al. An alternative method to recover *Toxoplasma gondii* from greenery and fruits. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 26, n. 5–6, p. 600–605, 2016.
- DIXON, B. R. Parasitic illnesses associated with the consumption of fresh produce — an emerging issue in developed countries. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 104–109, 1 abr. 2016.
- DUBEY, J. P. et al. Effect of High Temperature on Infectivity of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Pork. **The Journal of Parasitology**, v. 76, n. 2, p. 201, abr. 1990.
- DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375–1424, set. 2012.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animals and Man**. Boca Raton, FL: Cambridge University Press (CUP), 1988.
- DUBEY, J. P.; CHRISTIE, E.; PAPPAS, P. W. Characterization of *Toxoplasma gondii* from the feces of naturally infected cats. **The Journal of infectious diseases**, v. 136, n. 3, p. 432–5, set. 1977.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-Induced Toxoplasmosis in Cats*. **The Journal of Protozoology**, v. 19, n. 1, p. 155–177, fev. 1972.
- EVANS, R. Life cycle and animal infection. In: **In: Ho-Yen DO, Joss AWL, editors. Human toxoplasmosis. Oxford: Oxford University Press. [s.l: s.n.]. p. 26–55. 1992.**

- 1 FERREIRA, F. P. et al. The effect of water source and soil supplementation on parasite
2 contamination in organic vegetable gardens. **Revista Brasileira de Parasitologia**
3 **Veterinaria**, v. 27, n. 3, p. 327–337, 1 jul. 2018.
- 4 FRENKEL, J. K. Toxoplasmose. In: **Veronesi R & R Foccacia R. Tratado de**
5 **Infectologia**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu: [s.n.]. p. 1290–1305. 1972.
- 6 FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages
7 identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 893–896, 1970.
- 8 GAJADHAR, A. A. et al. Foodborne apicomplexan protozoa. In: **Foodborne Parasites**
9 **in the Food Supply Web**. [s.l.] Elsevier, p. 101–147, 2015.
- 10 HOHWYER, J. et al. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*,
11 *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves.
12 **Food Microbiology**, v. 57, p. 36–44, 2016.
- 13 HOLLIMAX, E. W. Human Toxoplasmosis. **Epidemiology and Infection**, v. 110, n. 1,
14 p. 182–182, fev. 1993.
- 15 ISTIFANUS, W. A.; PANDA, S. M. Parasitic agents in fresh fruits and vegetables sold
16 in open markets in Bauchi, Nigeria. **Journal of Food Quality and Hazards Control**,
17 v. 5, n. 3, p. 84–88, 2018.
- 18 KHAN, W. et al. Parasitic contamination of fresh vegetables sold in open markets: a
19 public health threat. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. e242614, 22 nov. 2021.
- 20 KIM, M. et al. Quantification of viable protozoan parasites on leafy greens using
21 molecular methods. **Food Microbiology**, v. 99, p. 103816, 2021.
- 22 KOTULA, A. W. et al. Effect of Freezing on Infectivity of *Toxoplasma Gondii* Tissue
23 Cysts in Pork. **Journal of food protection**, v. 54, n. 9, p. 687–690, set. 1991.
- 24 LALONDE, L. F.; GAJADHAR, A. A. Detection and Differentiation of Coccidian Oocysts
25 by Real-Time PCR and Melting Curve Analysis. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 4,
26 p. 725–730, ago. 2011.
- 27 LALONDE, L. F.; GAJADHAR, A. A. Optimization and validation of methods for
28 isolation and real-time PCR identification of protozoan oocysts on leafy green
29 vegetables and berry fruits. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 2, p. 1–7, 2016.
- 30 LASS, A. et al. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits
31 and vegetables samples. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**
32 **Diseases**, v. 31, n. 6, p. 1101–1108, jun. 2012.
- 33 LI, J. et al. Detection of human intestinal protozoan parasites in vegetables and fruits:
34 a review. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, 2020.
- 35 MANSFIELD, L. S.; GAJADHAR, A. A. *Cyclospora cayetanensis*, a food- and
36 waterborne coccidian parasite. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1–2, p. 73–90, dez.
37 2004.
- 38 MARCHIORO, A. A. et al. First Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the Fresh Leafs
39 of Vegetables in South America. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 9,
40 p. 624–626, 2016.
- 41 MARIWAH, S.; DRANGERT, J. O. Community perceptions of human excreta as

- 1 fertilizer in peri-urban agriculture in Ghana. **Waste management & research : the**
2 **journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association,**
3 **ISWA**, v. 29, n. 8, p. 815–822, ago. 2011.
- 4 MITSUKA-BREGANÓ, R.; LOPES-MORI, F. M. R.; NAVARRO, I. T. Toxoplasmose
5 adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e
6 condutas. **Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em**
7 **saúde, diagnóstico, tratamento e condutas**, 2010.
- 8 MOHAMMED, R. G.; KADHIM, H. S. H.; ALI, J. F. Diagnostic study on intestinal
9 parasites isolated from raw consumed vegetables in misan city/ iraq. **Indian Journal**
10 **of Public Health Research and Development**, v. 10, n. 8, p. 1236–1240, 2019.
- 11 MOURA, F. **Ocorrência de toxoplasmose congênita, avaliação do conhecimento**
12 **sobre toxoplasmose e do acompanhamento sorológico das gestantes e**
13 **implantação de medidas**. [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz, 2016.
- 14 PINTO-FERREIRA, F. et al. Investigation and environmental analysis of samples from
15 outbreak of toxoplasmosis at research institution in Londrina, Paraná, Brazil, 2016.
16 **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 3, p. 518–521, jul. 2019.
- 17 PINTO-FERREIRA, F. et al. Molecular diagnosis of the curly lettuce parasitic
18 contamination from hydroponic cultivation from supermarkets [Diagnóstico molecular
19 da contaminação parasitária de alface crespa de cultivo hidropônico em
20 supermercados]. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 29, n. 4, p. 1–
21 5, 2020.
- 22 SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal**
23 **of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014–1026, 1 nov. 2012.
- 24 SCOTT, C. A.; FARUQUI, N. I.; RASCHID-SALLY, L. Wastewater use in irrigated
25 agriculture: management challenges in developing countries. **Wastewater use in**
26 **irrigated agriculture: confronting the livelihood and environmental realities**, p.
27 1–10, jan. 2004.
- 28 SHAPIRO, K. et al. Simultaneous detection of four protozoan parasites on leafy greens
29 using a novel multiplex PCR assay. **Food Microbiology**, v. 84, p. 103252, 2019.
- 30 TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals
31 to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–1258,
32 nov. 2000.
- 33 VARELLA, I.R.S. Prevalência de Toxoplasmose Aguda em Gestantes, Incidência de
34 Toxoplasmose Congênita e Desempenho de Testes Diagnósticos em Toxoplasmose
35 Congênita. Tese (Doutorado em Epidemiologia) Universidade Federal do Rio Grande
36 do Sul, Porto Alegre, 2007.
- 37 WAINWRIGHT, K. E. et al. Chemical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in
38 water. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 4, p. 925–931, ago. 2007.
- 39
40
41

1 **4. HIPÓTESE**

2 A ingestão de vegetais crus é uma forma relevante de transmissão da
3 toxoplasmose. Um método eficaz de recuperação de oocisto auxiliaria em uma
4 detecção mais precisa do parasita.

5

6 **5. OBJETIVOS**

7

8 **5.1. Objetivo geral**

9 Padronizar metodologia de recuperação de oocistos de *T. gondii* em hortaliças
10 folhosas que seja de aplicação prática nos laboratórios.

11

12 **5.2. Objetivo específico**

- 13 ● Definir o melhor tampão de eluição, a melhor forma de homogeneização e
14 filtração, e o melhor tempo e rotação da centrifugação;
- 15 ● Testar eficácia dos métodos de recuperação de hortaliças através de testes
16 moleculares.
- 17 ● Avaliar a sensibilidade do método de recuperação proposto por meio da
18 PCR convencional.

19

20

21

22

23

24

6. ARTIGO

Padronização e validação de um método para recuperação de oocistos de *Toxoplasma gondii* em hortaliças folhosas

Resumo

Nos últimos 20 anos, a ingestão de hortaliças de consumo cru e água contaminadas por *Toxoplasma gondii*, passou a ter maior relevância em comparação às demais vias de transmissão envolvidas em surtos. Sabe-se que há um desafio no diagnóstico em amostras ambientais, principalmente em vegetais, pois há diversos inibidores de PCR no ambiente, além disso, até o momento, não há uma técnica validada de fácil execução em laboratórios. Devido a essa dificuldade, o objetivo do presente trabalho foi padronizar uma técnica de recuperação de oocistos de *T. gondii* em alface crespa. Para a padronização da técnica utilizou-se 1000 oocistos/mL de *T. gondii* para contaminação de cada 50g de amostra. Para a recuperação, foram testadas como soluções extratoras, a água destilada, salina (NaCl 0,085%), Tween 80 (0,1%), Glicina 1M e Dodecil sulfato de sódio (SDS 0,1%); homogeneização manual, mecânica e trituração por *mixer*; uso ou não de filtração por gaze; e centrifugação (1500xg e 2100xg/10min), somando 60 protocolos diferentes, em triplicata. Foi realizada extração de DNA e qPCR para quantificar e avaliar a eficiência. Quanto à solução de recuperação, a água, a Glicina e o Tween 80 apresentaram 75,0% (9/12) dos protocolos com pelo menos uma replicata positiva, enquanto a salina e SDS, 8,3% (1/12) ($p < 0,001$). Com relação ao tipo de homogeneização, a manual e a mecânica apresentaram 60,0% (12/20) dos protocolos com pelo menos uma replicata positiva. Não houve diferença estatística relacionada à amplificação quanto à filtração e às velocidades de rotação. Após a triagem inicial, realizou-se análise estatística entre as variáveis de maior recuperação: água, Glicina e o Tween 80 e tipo de homogeneização. A homogeneização manual apresentou a maior repetibilidade, variando de 83,2% a 91,7% entre as replicatas. Considerando a sensibilidade, amplificação, repetibilidade e número de cópias, o melhor método de recuperação de oocistos em alface foi: solução extratora de Glicina 1M com homogeneização manual e 10 minutos de centrifugação a 2100 xg.

Palavras-chave: hortaliças, diagnóstico, Tween 80, glicina 1M, SDS 0,01%

1 **Standardization and validation of a method for recovering *Toxoplasma gondii*** 2 **oocysts from leafy vegetables**

3 4 **Abstract**

5
6 In the last 20 years, the ingestion of raw vegetables and water contaminated by
7 *Toxoplasma gondii* has become more relevant than other transmission routes involved
8 in outbreaks. It is known that there is a challenge in diagnosing environmental samples,
9 especially vegetables, because there are several PCR inhibitors in the environment,
10 and so far there is no validated technique that is easy to perform in laboratories. Due
11 to this difficulty, the aim of this study was to standardize a technique for recovering *T.*
12 *gondii* oocysts from lettuce. To standardize the technique, 1000 oocysts/mL of *T. gondii*
13 were used to contaminate 50g sample each. For recovery, distilled water, saline (NaCl
14 0.085%), Tween 80 (0.1%), Glycine 1M and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS 0.1%) were
15 tested as extractant solutions; manual, mechanical homogenization and grinding by
16 *mixer*; use or not of gauze filtration; and centrifugation (*1500xg* and *2100xg/10min*), in
17 60 different protocols, in triplicate. DNA extraction and qPCR were carried out to
18 quantify and evaluate efficiency. As for the recovery solution, water, Glycine and
19 Tween 80 showed 75.0% (9/12) of the protocols with at least one positive replicate,
20 while saline and SDS showed 8.3% (1/12) ($p<0.001$). With regard to the type of
21 homogenization, manual and mechanical homogenization had 60.0% (12/20) of the
22 protocols with at least one positive replicate. There was no statistical difference in
23 amplification between filtration and rotation speeds. After the initial screening, a
24 statistical analysis was carried out between the variables with the highest recovery:
25 water, glycine and Tween 80 and type of homogenization. Manual homogenization
26 showed the highest repeatability, ranging from 83.2% to 91.7% between replicates.
27 Considering the sensibility, amplification, repeatability and number of copies, the best
28 method for recovering oocysts in lettuce was: 1M Glycine extract solution with manual
29 homogenization.

30 **Keywords:** vegetables, diagnosis, Tween 80, glycine 1M, SDS 0.01%

31

32

1 Introdução

2

3 A toxoplasmose é uma antroponose de grande importância mundial,
4 principalmente pela alta frequência de surtos. Em imunocompetentes, comumente
5 ocorre de forma benigna com ausência ou presença de sinais clínicos brandos, em
6 gestantes, pode acarretar abortamento ou malformações congênitas, em
7 imunocomprometidos os sinais são graves e podem levar a óbito (Bowie et al., 1997).

8 O principal meio de transmissão da doença atualmente é o consumo de carne
9 crua ou malcozida contendo cistos teciduais, bem como a ingestão de água e
10 hortaliças contaminadas com oocistos de *Toxoplasma gondii*. A contaminação de
11 vegetais destinados ao consumo humano pode acontecer em diferentes estágios da
12 produção, desde a qualidade da água usada para irrigação até o uso de adubos de
13 origem animal, além das práticas de armazenamento, transporte e manipulação
14 durante a colheita. Esses fatores estão diretamente ligados à possibilidade de
15 contaminação, conforme observado por Ferreira et al., (2018).

16 *T. gondii* é reconhecido como um dos principais parasitas responsáveis por
17 doenças transmitidas por alimentos e água na população, tendo um impacto
18 significativo, tanto na economia, quanto na saúde pública (FAO, 2012). No Brasil, mais
19 de 40 surtos foram documentados na literatura, durante os últimos 50 anos, dos quais
20 cerca de 45,0% foram associados aos oocistos como forma biológica, e a água e as
21 hortaliças foram apontadas como as principais vias de transmissão (Pinto-Ferreira et
22 al., 2019).

23 A identificação das prováveis causas de um surto de toxoplasmose depende,
24 principalmente de investigação epidemiológica, uma vez que, o aumento nos casos
25 da doença é percebido meses após os surtos, quando as amostras contaminadas do
26 período já não estão mais disponíveis para análise, uma vez que foram consumidas
27 ou descartadas (Mireles et al., 2015). Além disso, as amostras ambientais,
28 geralmente, contêm um número baixo de oocistos, o que dificulta sua detecção. É
29 importante observar que, até o momento, não existem métodos comprovadamente
30 eficazes e padronizados para a recuperação de oocistos de *T. gondii* que sejam
31 aplicáveis em laboratórios com recursos limitados (Chalmers et al., 2020). Esses
32 métodos, quando disponíveis, geralmente se aplicam a outros protozoários, como
33 *Cryptosporidium parvum* e *Giardia intestinalis* descritas no ISO 18744:2016. Diante
34 disso, este trabalho, teve como objetivo padronizar uma técnica de recuperação de

1 oocistos de *T. gondii* em alface crespa de fácil execução, baixo custo e que auxilie na
2 investigação de surtos de toxoplasmose.

3

4 **Material e Métodos**

5

6 Para o estudo foram utilizados oocistos de *T. gondii* da cepa ME-49 (LUNDE;
7 JACOBS, 1983) provenientes de banco de oocistos do Laboratório de Protozoologia
8 Veterinária da Universidade Estadual de Londrina (UEL). O projeto foi aprovado pelo
9 Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA/UEL) sob o n° 51/07. Os oocistos
10 de *T. gondii* foram armazenados em ácido sulfúrico a 2%.

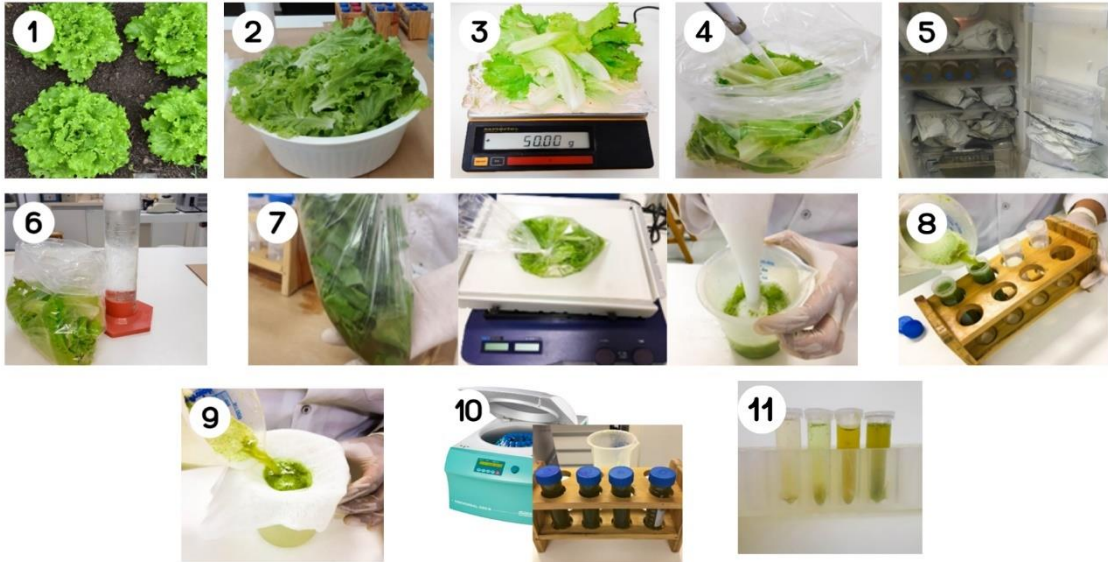
11 A hortalíça utilizada para a padronização da metodologia foi a alface crespa
12 (*Lactuca sativa*), possui superfície rugosa o qual facilita na adesão dos oocistos e, foi
13 selecionada por ser uma das mais consumidas, na forma crua, no Brasil (BARROS;
14 MOREIRA; CAMELO, 2014). Os vegetais foram cortesia da Fazenda Escola da
15 UEL, que cederam 65 touceiras de alface, para obtenção de 180 amostras de 50 g
16 cada.

17 Após coleta, foram imediatamente higienizadas, secas e cada amostra de 50 g
18 foi inoculada com 1 mL de água ultrapura contendo 1.000 oocistos de *T. gondii* (a
19 concentração de parasitas foi estimada utilizando contagem por câmara de
20 Neubauer). A inoculação foi realizada cuidadosamente de forma a garantir que os
21 oocistos fossem distribuídos de maneira homogênea em toda superfície das folhas.
22 As folhas inoculadas foram mantidas sob refrigeração (4°C) por 48 horas para garantir
23 que os oocistos se fixassem, assim como ocorre no ambiente (Figura 1).

24

25 **Figura 1.** Esquema empregado para padronização do método de recuperação de
26 *Toxoplasma gondii* em hortaliças. Pés de alface utilizados para coleta de amostras
27 (01), amostras higienizadas e secas (02), separação de amostras de 50g (03),
28 inoculação com 1ml de água ultrapura contendo 1.000 oocistos de *T.gondii* em cada
29 amostra pesada (04), armazenamento sob refrigeração a 4°C/48 horas (05), amostras
30 contaminadas homogeneizadas com 200 mL de solução de lavagem de acordo com
31 sua identificação (06), realização da agitação manual, mecânica durante cinco
32 minutos em saco plástico, ou trituração em Becker com auxílio de mixer, até que as
33 amostras tornassem líquidas, respectivamente (07), cada solução distribuída em
34 quatro tubos de centrifugação de fundo cônico de 50 mL (08), utilizando, ou não, gaze
35 dupla para filtração das folhas previamente (09), dupla centrifugação durante 10

- 1 minutos testando as velocidades de rotação de 1500 xg ou 2100 xg (10), pellets
 2 armazenados em microtubo de 1,5 mL à -20°C até a extração de DNA (11).



3

4

5 Para padronizar a metodologia de recuperação, foram testadas, em triplicata,
 6 cada etapa e suas variáveis, tais como: solução extratora, tipo de homogeneização,
 7 presença ou ausência de filtração e velocidade de centrifugação. Cinco soluções de
 8 lavagens foram avaliadas neste estudo: água destilada, salina (NaCl 0,085%), Tween
 9 80 (0,1%), Glicina 1M e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS 0,1%). As alfaces
 10 contaminadas foram homogeneizadas com 200 mL de cada solução de lavagem, a
 11 homogeneização procedeu-se de três formas: agitação manual; mecânica, utilizando
 12 o agitador de mesa (Elmeco, The Hot Rock model RP-50, EUA), durante cinco minutos
 13 em saco plástico, ou ainda, trituração em Becker com auxílio de mixer, até que as
 14 amostras tornassem líquidas. Cada solução, foi então distribuída em quatro tubos de
 15 centrifugação de fundo cônico de 50 mL, utilizando, ou não, gaze dupla para filtração
 16 das folhas. As amostras passaram por dupla centrifugação durante 10 minutos
 17 testando as velocidades de rotação de 1500 xg e 2100 xg (Figura 2).

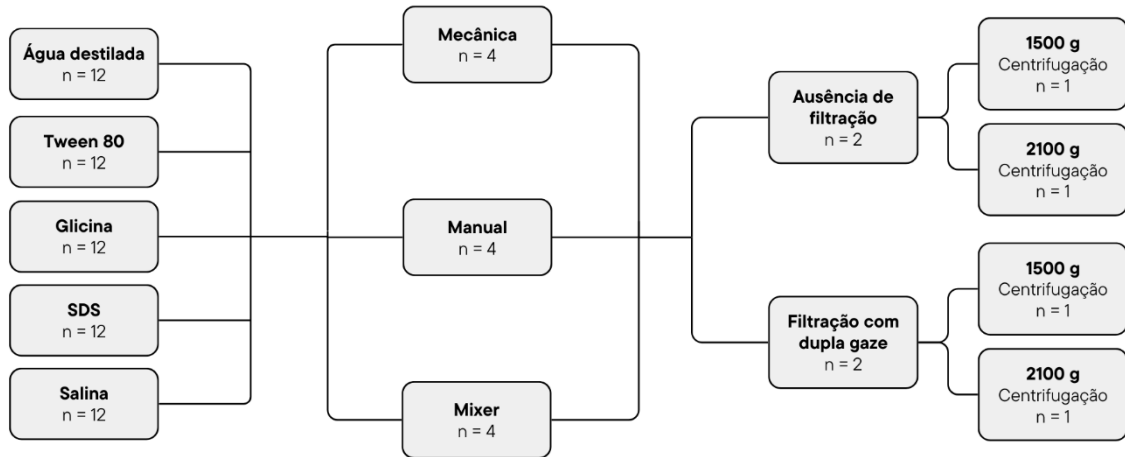
18

19

20

21

- 1 **Figura 2.** Fluxograma das análises realizadas com alfaces cresas para padronização
 2 do método.



Todas os testes foram realizados em triplicata, totalizando 180 análises

3

4 Os pellets, resultantes da centrifugação foram armazenados em microtubo de
 5 1,5 mL à -20°C até a extração de DNA.

6

7 *Análise molecular*

8

9 A extração de DNA, das 180 amostras, foi realizada com o Kit PureLink
 10 Genomic DNA (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) de acordo com as
 11 recomendações do fabricante.

12 Para amplificação e quantificação de DNA utilizaram-se os primers Tox9F
 13 (AGGAGAGATATCAGGACTGTAG) e Tox11R (GCGTCGTCTCGTCTAGATCG) e a
 14 Probe: ToxPT1, descritos por (REISCHL et al., 2003). O SYBR® Green Master Mix
 15 (Applied Biosystems) foi usado para detectar a fluorescência na PCR em tempo real
 16 usando o sistema StepOne™ (Applied Biosystems, Waltham, EUA). Para o ensaio,
 17 cada mistura de reação teve um volume final de 20 µL e foi realizada em duplicata.

18 Para quantificação de oocistos por meio da q-PCR foi necessária a produção
 19 de curva padrão, contendo as seis concentrações: 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰,
 20 conforme descrito por Opsteegh et al., (2010)

21

1 *Análise estatística*

2

3 Inicialmente, como triagem, foi realizada análise estatística por meio do
4 software Epi info 3.5.4 (Dean et al., 1990), utilizando o teste t de Student para
5 determinar significância estatística entre as diferentes condições testadas.

6 Após a triagem dos resultados foi utilizado R environment version 3.6.2,
7 packages epitools e epiDisplay (Aragon, 2020; Chongsuvivatwong, 2018; R Core
8 Team, 2019), foram realizadas análises de regressão logística adotando-se nível de
9 significância de 5%, a força de associação foi medida por meio dos valores de odds
10 ratio (OR) e respectivo intervalo de confiança de 95%. Diferentes soluções extratoras,
11 formas de homogeneização, filtração e velocidade de centrifugação foram
12 consideradas variáveis independentes e a positividade de pelo menos uma réplica na
13 qPCR a variável dependente.

14 Classificaram-se os protocolos quanto à amplificação em ao menos uma das
15 triplicatas, repetibilidade da amplificação (0,33; 0,67 ou 1 dentre as triplicatas), média
16 e desvio-padrão do número de cópias amplificadas.

17

18 *Avaliação de sensibilidade*

19

20 Após padronização, a melhor técnica passou por teste de sensibilidade, na
21 qual avaliou-se a quantidade mínima de oocistos detectáveis. Utilizou-se na
22 contaminação 5, 10, 25, 50, 100 oocistos. A extração de DNA também foi realizada
23 com o Kit PureLink Genomic DNA de acordo com as recomendações do fabricante,
24 na PCR o fragmento de 529 pb foi amplificado para detecção do DNA do *T. gondii*,
25 utilizou-se os iniciadores descritos por Homan et al. (2000). Os produtos da PCR foram
26 visualizados após a eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SyBr safe
27 DNA (Invitrogen®, Califórnia, EUA).

28

29

30

31

1 Resultados

2

3 No total, foram 60 protocolos diferentes, em triplicata, totalizando 180 amostras
4 analisadas. Entre os tampões de eluição avaliados, observou-se que a água, a Glicina
5 e o Tween 80 apresentaram 75,0% (9/12) dos protocolos com pelo menos uma
6 replicata positiva, enquanto a salina e SDS 8,3% (1/12) ($p < 0,001$).

7 Com relação ao tipo de homogeneização, a manual e a mecânica apresentaram
8 60,0% (12/20) dos protocolos com pelo menos uma replicata positiva. O *mixer*
9 mostrou-se com menor capacidade de recuperação 20,0%; ((5/20); $p = 0,03$). Não
10 houve diferença estatística relacionada à amplificação quanto à filtração e às
11 velocidades de rotação. Durante a análise estatística entre as variáveis de maior
12 recuperação: água, Glicina e o Tween 80 e tipo de homogeneização (Tabela 1), a
13 Glicina foi a solução de eleição para a padronização do método, e quanto a
14 homogeneização, a manual, o qual apresentou a maior repetibilidade, variando de
15 83,25% a 91,75% entre as replicatas. Uma vez que observando-se os desvios-padrão
16 do número de cópias amplificadas entre as replicatas, a água e Glicina tiveram maior
17 repetibilidade na homogeneização manual, enquanto no Tween 80 na mecânica. Ao
18 avaliar a média do número de cópias, a mecânica apresentou melhores resultados,
19 variando de 175,68 a 193,73.

20

21 **Tabela 1** - Comparação da repetibilidade, número de cópias amplificadas e desvio
22 padrão, entre os tampões de eluição, água, Tween 80 e glicina, que apresentaram
23 maior porcentagem de amplificação.

SOLUÇÃO	HOMOGENEIZAÇÃO	REPETIBILIDADE	Nº CÓPIAS AMPLIFICADAS	DESVIO PADRÃO
ÁGUA	MANUAL	84%	61,0	10,4
ÁGUA	MECÂNICA	83%	193,7	328
TWEEN 80	MANUAL	92%	86,0	39,4
TWEEN 80	MECÂNICA	67%	175,7	28,6
GLICINA	MANUAL	83%	165,2	21,6

GLICINA	MECÂNICA	50%	183,0	60,0
---------	----------	-----	-------	------

1

2

3 Os tempos de centrifugação, nas rotações de 2100xg e 1500xg, não
4 demonstraram diferenças estatisticamente significativas, bem como o resultado
5 comparativo entre o uso e não uso da filtração das amostras.

6 Quanto ao teste de sensibilidade, realizado com a técnica padronizada, a
7 presença de oocistos foi detectada em amostras com concentração a partir de 25
8 oocistos por 50g de alface.

9

10 **Discussão**

11

12 No presente estudo, a glicina e Tween 80 apresentaram melhores resultados,
13 e foram empregados anteriormente em diversos trabalhos (Shapiro et al., 2019;
14 Caradonna et al., 2017; De Souza et al., 2016; Hohweyer et al., 2016; Lalonde;
15 Gajadhar, 2016). Ambos são detergentes neutros e a glicina está disponível em pó, o
16 que favorece a sua diluição, além disso, não forma demasiada espuma. Por outro
17 lado, o Tween 80 é um líquido viscoso, apresentando desafios em sua diluição. Em
18 relação às demais soluções de extração, o SDS apresentou menor porcentagem de
19 recuperação, possivelmente, devido ao excesso de espuma, que pode ter interferido
20 na recuperação dos oocistos (Chandra; Torres; Ortega, 2014), outros protocolos
21 sugerem a utilização do anti-espuma na solução, resultando em melhor recuperação
22 (Caradonna et al., 2017).

23 Em relação à utilização de água destilada, em nosso trabalho foi a terceira
24 solução que apresentou melhor resultado. No entanto, essa abordagem não alcançou
25 a mesma eficácia descrita por Berrouch et al. (2020), que demonstraram uma alta
26 recuperação de oocistos em 132 amostras de alface e outras hortaliças em de um
27 mercado em Marrakech. No qual utilizaram água destilada como solução de
28 homogeneização, sendo que 22 amostras foram positivas para *T. gondii*.

29 A salina, como solução de lavagem, não apresentou bons resultados na
30 recuperação de oocistos quando associada à análise molecular, porém a sua
31 utilização pode ser mais vantajosa quando aplicada a técnica de Sheater, como

1 realizado por Dardona et al. (2021), em que também utilizaram salina para análise nas
2 amostras de vegetais e, observaram que houve maior positividade quando aplicada
3 essa técnica.

4 A recuperação manual e mecânica tiveram bons resultados e semelhantes
5 quanto à metodologia, diferenciando quando comparada à solução de extração. O
6 experimento realizado por Chandra et al. (2014) observaram maior taxa de
7 recuperação de oocistos de *Cyclospora cayetanensis* no método manual quando
8 comparado ao *mixer*. A hipótese é de que o manual permite maior abrasão na
9 superfície das folhas. Enquanto o *mixer* apresentou menor taxa de recuperação,
10 possivelmente por promover destruição das folhas e acúmulo de matéria orgânica na
11 amostra, causando uma extração ineficiente e/ou inibição da qPCR.

12 A utilização da filtração com gaze durante a padronização, teve por objetivo a
13 retenção de matéria orgânica que pode interferir na amplificação de DNA. Contudo, o
14 uso ou não da gaze, não teve diferença significativa. É importante notar que vários
15 outros estudos não empregaram a filtração em seus métodos e, ainda assim,
16 obtiveram resultados positivos na recuperação dos oocistos (Kim et al., 2021; Lalle et
17 al., 2018; Shapiro et al., 2019).

18 As velocidades de centrifugação testadas estiverem todas acima de um limiar
19 necessário para uma recuperação eficaz dos oocistos, então, qualquer variação
20 adicional pode não influenciar significativamente nos resultados.

21 Em relação ao teste de sensibilidade, a capacidade de recuperar oocistos em
22 concentrações tão baixas quanto 25 oocistos por 50 g de alface é uma indicação
23 positiva da sensibilidade da técnica empregada no nosso trabalho. Isso significa que,
24 mesmo quando as hortaliças estão contaminadas com quantidade relativamente baixa
25 de oocistos, o método ainda é capaz de detectá-los de maneira confiável, além disso
26 a PCR convencional está disponível para utilização em diversos laboratórios.

28 **Conclusão**

29
30 A utilização da solução de glicina, homogeneização manual, não necessidade
31 de filtração da solução em gaze e centrifugação a 2.100 xg, foi a metodologia eficiente
32 e eficaz para recuperação dos oocistos, em hortaliças folhosas. Com este estudo foi
33 possível determinar um método de fácil execução, simplificado e de baixo custo para

1 a detecção de DNA de *T. gondii* em amostras de alface, o qual poderá auxiliar no
2 diagnóstico em surtos e na pesquisa a campo, podendo ser aplicado em qualquer
3 laboratório, pois o método utiliza soluções de baixo custo, de fácil obtenção e
4 equipamentos presentes nos laboratórios.

8 Referências bibliográficas

10 AL-MEGRM, W. A. I. Prevalence intestinal parasites in leafy vegetables in Riyadh,
11 Saudi Arabia. **International Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 2, p. 20–23,
12 2010.

13 BARROS, T. M. P. DE; MOREIRA, W. M. Q.; CAMELO, A. D. Estudo da literatura
14 sobre as metodologias de produção e cultivo da alface (Literary study on the
15 methods of production and crop of. **Revista Fafibe On-Line**, v. 7, n. 1, p. 26–34,
16 2014.

17 BERROUCH, S. et al. Cryptosporidium spp., Giardia duodenalis and Toxoplasma
18 gondii detection in fresh vegetables consumed in Marrakech, Morocco. **African**
19 **health sciences**, v. 20, n. 4, p. 1669–1678, dez. 2020.

20 BOWIE, W. R. et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking
21 water. **Lancet**, v. 350, n. 9072, p. 173–177, 19 jul. 1997.

22 CARADONNA, T. et al. Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-
23 eat packaged salads on sale in Italy. **Food Microbiology**, v. 67, p. 67–75, 2017.

24 CHALMERS, R. M. et al. Parasite detection in food: Current status and future needs
25 for validation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 99, p. 337–350, 2020.

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

29 DARDONA, Z. et al. Occurrence of Toxoplasma gondii on Raw Leafy Vegetables in
30 Gaza, Palestine. **Journal of Food Protection**, v. 84, n. 2, p. 255–261, fev. 2021.

31 DE SOUZA, C. Z. et al. An alternative method to recover Toxoplasma gondii from
32 greenery and fruits. **International Journal of Environmental Health Research**, v.
33 26, n. 5–6, p. 600–605, 2016.

34 DUBEY, J. P. et al. Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of

- 1 infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse
2 strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. **Parasitology**,
3 v. 139, n. 1, p. 1–13, jan. 2012.
- 4 HOHWEYER, J. et al. Simultaneous detection of the protozoan parasites
5 *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on
6 basil leaves. **Food Microbiology**, v. 57, p. 36–44, 2016.
- 7 ISO 18744. **Microbiology of the food chain — Detection and enumeration of**
8 ***Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh leafy green vegetables and berry fruits.**
9 Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/63252.html>>. Acesso em: 16 nov.
10 2023.
- 11 KIM, M. et al. Quantification of viable protozoan parasites on leafy greens using
12 molecular methods. **Food Microbiology**, v. 99, p. 103816, 2021.
- 13 LALLE, M. et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification-Lateral-Flow Dipstick
14 (LAMP-LFD) to detect *Toxoplasma gondii* oocyst in ready-to-eat salad. **Food**
15 **Microbiology**, v. 70, p. 137–142, 2018.
- 16 LALONDE, L. F.; GAJADHAR, A. A. Detection of *Cyclospora cayetanensis*,
17 *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii* on imported leafy green vegetables in
18 Canadian survey. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 2, p. 8–14, 2016.
- 19 LUNDE, M. N.; JACOBS, L. Antigenic differences between endozoites and
20 cystozoites of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of parasitology**, v. 69, n. 5, p. 806–
21 808, out. 1983.
- 22 OPSTEEGH, M. et al. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat
23 samples using magnetic capture and PCR. **International Journal of Food**
24 **Microbiology**, v. 139, n. 3, p. 193–201, 2010.
- 25 REISCHL, U. et al. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of
26 Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer
27 hybridization probes. **BMC Infectious Diseases**, v. 3, p. 1–9, 2003.
- 28 SHAPIRO, K. et al. Simultaneous detection of four protozoan parasites on leafy
29 greens using a novel multiplex PCR assay. **Food Microbiology**, v. 84, p. 103252,
30 2019.
- 31
32
33
34

1
2
3
4
5

6 **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

7

8 A padronização de um método para a recuperação de oocistos de *Toxoplasma*
9 *gondii* em hortaliças é importante para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos,
10 assim como para sua aplicação prática em investigações, pesquisas de campo, e em
11 diversos laboratórios. Principalmente pelo aumento do número de casos de surtos por
12 toxoplasmose envolvendo hortaliças folhosas.

13 A presente pesquisa foi capaz de identificar a glicina como a solução extratora
14 mais eficaz para a recuperação de oocistos, além de estabelecer a padronização do
15 processo de homogeneização manual, centrifugação a 2.100 xg por 10 minutos e
16 análise por meio da q-PCR e PCR convencional. Essa padronização do método
17 destaca-se como uma abordagem promissora para uma detecção precisa e confiável
18 do *T. gondii*.

19 Os resultados obtidos no teste de sensibilidade, por meio da PCR
20 convencional, confirmaram a validade e sensibilidade deste método, o qual demonstra
21 que o método proposto é útil, eficaz e importante para monitorar a segurança alimentar
22 e prevenir potenciais riscos à saúde pública, além de poder ser utilizado este método
23 para detecção do parasito em laboratórios que não possuem qPCR. Além disso,
24 método de recuperação trouxe evidências para pesquisas com soluções de
25 lavagem/eliminação de *T. gondii* em hortaliças.