
Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp em hortaliças minimamente processadas, comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP, Brasil

Divani Maria CAPUANO¹, Sônia de P. Toledo PRADO¹, Gutemberg de Melo ROCHA²

¹ Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto

² Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Cryptosporidium spp é considerado um importante agente etiológico de diarreia na população humana, particularmente nos indivíduos imunocomprometidos, nos quais as manifestações clínicas da infecção são mais severas. A transmissão deste protozoário ocorre principalmente pela via fecal-oral, através das formas infectantes, os oocistos, que são eliminados juntamente com as fezes dos hospedeiros infectados. Os oocistos são altamente resistentes às adversidades ambientais e aos processos de desinfecção e tratamento da água, o que favorece a contaminação da água e dos alimentos. Em vários países, muitos surtos da doença foram atribuídos ao consumo de água contaminada³, sendo que no Brasil pesquisadores constataram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp em poços localizados na cidade de Itaquaquecetuba, SP⁴ e nas águas superficiais do rio Atibaia em Campinas, SP². A importância do estudo sobre a ocorrência deste parasito na água foi reforçada pelas citações da Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde, que recomenda a inclusão da pesquisa do *Cryptosporidium* para se atingir o padrão de potabilidade da água¹.

Para amostras clínicas, os métodos diagnósticos para *Cryptosporidium* já estão bem estabelecidos. Contudo, em amostras ambientais a recuperação dos oocistos é dificultada, pois geralmente eles estão presentes em pequeno número e ainda não há um método que possibilite um enriquecimento deste organismo, semelhante às bactérias. Diferentes métodos diagnósticos têm sido desenvolvidos para a detecção de *Cryptosporidium* em água e alimentos, porém ainda não há um método universalmente aceito. As técnicas já realizadas são baseadas em adaptações da metodologia empregada para análises clínicas. Portanto, é de extrema importância o desenvolvimento de métodos eficazes de pesquisa deste parasito em amostras ambientais. Os vegetais minimamente processados após passarem por algumas etapas de processamento visam proporcionar ao consumidor um produto conveniente, com a manutenção da qualidade nutritiva e sensorial muito próximas as do produto fresco, sendo que quando submetidos ao processo de higienização tenham garantida a se-

gurança microbiológica do produto, podendo ser oferecidos prontos para o consumo. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp em hortaliças minimamente processadas comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP.

Entre janeiro e agosto de 2006 foram analisadas 70 amostras de hortaliças folhosas (alface, chicória, almeirão, rúcula, couve, acelga, repolho branco e roxo, espinafre e agrião) minimamente processadas e higienizadas de nove diferentes marcas, adquiridas em supermercados de Ribeirão Preto. Na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp foram utilizadas 100 a 150 gramas de cada hortaliça. A lavagem das mesmas foi realizada através de duas técnicas distintas: quando as hortaliças apresentavam-se íntegras, as folhas foram esfregadas uma a uma com pincel chato nº 16 em 300 ml de água destilada. As verduras picadas foram deixadas imersas em 300 ml de água destilada por 20 minutos e lavadas por enxaguadura em saco plástico, seguido de agitação manual por 1 minuto. As águas resultantes da lavagem foram separadas em duas alíquotas. Um volume de 100 ml foi submetido à filtração através de membrana de acetato de celulose estéril. Após a filtração, a membrana foi colocada em placa de Petri esterilizada para raspagem e lavagem da mesma, com 2 mL da solução de Tween 80 a 0,1% em PBS. O líquido resultante da lavagem foi centrifugado a 2.600 rpm por 15 minutos, sendo o sedimento examinado por imunofluorescência direta utilizando-se o kit da Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio), conforme as instruções do fabricante. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência com objetivas de 10X e 40X. O restante da água de lavagem (200mL) foi deixada em repouso em cálice cônico de vidro por 24 horas. Após este tempo, 50 mL do sedimento foi submetido à centrifugação a 2500 rpm por 8 minutos. Com o sedimento obtido foram confeccionados esfregaços em lâminas, os quais foram corados pela técnica de Ziehl – Neelsen modificada. As lâminas foram observadas sob microscopia óptica, utilizando-se objetiva de imersão. Oocistos de *Cryptosporidium* spp.

foram recuperados em duas hortaliças (2,8 %), sendo uma amostra de rúcula e uma de couve, apenas pela técnica da imunofluorescência direta.

Considerando os resultados obtidos, salientamos a necessidade da elaboração de uma legislação específica para este tipo de alimento, um maior monitoramento destes produtos por parte das autoridades sanitárias e a implementação de ações educativas destinadas aos produtores no sentido de assegurar a oferta de um alimento seguro para os consumidores.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Portaria nº 518 do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 mar. 2004, Seção 1, p. 266-70.
2. Franco, RMB; Rocha-Eberhardt, R.; Cantusio Neto, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 43:109-11, 2001.
3. Fricker, CR; Crabb, JH. Waterborne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. **Advanc. Parasit.**, 40:241-78, 1998.
4. Gamba, RC; Ciapina, EM; Espindola, RS; Pacheco, A; Pellizari, VH. Detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, São Paulo-Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, 31:151-3, 2000.