

LAÍS FERNANDA DE PAULI YAMADA

Detecção de nematódeos em alfaces (*Lactuca sativa* L.) comercializadas em São Paulo: diagnóstico diferencial com padrão de larvas de risco à saúde

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Vigilância em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto

SÃO PAULO

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Yamada, Lais Fernanda de Pauli

Detecção de nematódeos em alfaces (*Lactuca sativa* L.) comercializadas em São Paulo: diagnóstico diferencial com padrão de larvas de risco à saúde/ Lais Fernanda de Pauli Yamada. -2021.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Vigilância em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto.

1. Achados morfológicos e microscópicos. 2. Larva. 3. Helmintos. 4. Plantas. 5. Inocuidade dos alimentos. 6. Vigilância em saúde pública.

SES/CCD/CD - 432/2021

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

“O conhecimento emerge apenas através da invenção e da reinvenção, através da inquietante, impaciente, contínua e esperançosa investigação que os seres humanos buscam no mundo, com o mundo e uns com os outros.”

Paulo Freire

Dedicatória

A minha querida mãe Fátima, de quem herdei o gosto pela leitura, escrita e a busca contínua pelo conhecimento. Saudade e gratidão eterna!

Ao meu pai Adolfo, sempre presente, que não mediu esforços para me proporcionar uma educação de qualidade e incentivar a minha independência.

A minha irmã Luciana, pela torcida e por me inspirar com sua determinação e disciplina.

Ao meu esposo Anderson, por todo apoio e incentivo e a minha filha Laura, por trazer amor, alegria e leveza a nossa família.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto, pelos valiosos ensinamentos e excelente orientação. Um exemplo de professor e pesquisador, ético e comprometido, com o qual tive a sorte de compartilhar momentos de muito aprendizado e reflexão.

A Dra. Márcia Dimov Nogueira, por todo incentivo, atenção, orientação, apoio e amizade desde o início. Sou profundamente agradecida!

Aos queridos amigos do Núcleo de Morfologia e Microscopia, Augusta, Beto, Márcia, Maria, Roberto, Sandra e Leovil, por todo auxílio, incentivo, carinho e amizade de cada um.

A equipe do Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz pelo acolhimento e amizade.

Aos colegas do Centro de Alimentos e do Núcleo de Microbiologia pelo carinho, apoio, incentivo e amizade.

Ao William Henry Roldán Gonzáles, por disponibilizar larvas de *Strongyloides venezuelensis* para essa pesquisa, e por toda simpatia e generosidade.

Ao Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo, pela disponibilização de material para obtenção de larvas ancilostomídeos.

Ao renomado nematologista Prof. Dr. Luiz Carlos Camargo Barbosa Ferraz, pela contribuição com a identificação dos fitonematoides e nematoides de vida livre e por me presentear com preciosos ensinamentos.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa, Dra. Márcia Dimov, Dra. Maria de Fátima Costa Pires, Dr. Jose Eduardo Tolezano e Dra. Susana Angélica Zevallos Lescano, por terem aceitado colaborar com a minha formação. Sou muito grata pelas considerações e sugestões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de São Paulo e todos os seus membros pela oportunidade de aprimoramento profissional por meio do mestrado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos!

Resumo

O alimento é uma das principais vias de veiculação de patógenos ao homem, sendo as bactérias e suas toxinas, os vírus e os parasitos os principais agentes relacionados às doenças transmitidas por alimentos. Os vegetais frescos estão entre as maiores categorias de alimentos contaminados por grande variedade de parasitos presentes no solo ou na água de irrigação contaminada, principalmente, por esgotos sanitários. Os objetivos do trabalho foram avaliar a ocorrência de nematódeos de risco a saúde em amostras de alface (*Lactuca sativa* L.) do tipo crespa, *in natura* e higienizadas (prontas para o consumo), comercializadas na cidade de São Paulo; desenvolver padrão morfométrico dos estágios larvários de nematódeos de importância médica associados à contaminação alimentar e verificar a conformidade das alfaces higienizadas em relação à legislação sanitária quanto à presença de matérias estranhas, em especial nematódeos. Foram analisadas 60 amostras de alface crespa de cultivo tradicional, 30 *in natura* e 30 higienizadas, por metodologia de detecção de ovos e larvas de helmintos padronizada por Matosinhos et al. (2016), modificada e verificada. Os nematódeos detectados foram fixados, observados em microscópio de campo claro e submetidos à análise das características morfológicas e morfométricas para diagnóstico diferencial e estudo de similaridade com larvas padrões de *Strongyloides* spp., *Angiostrongylus* spp. e ancilostomídeos. Foram detectados nematódeos em 97% das amostras de alface *in natura* e em 43% das higienizadas. O intervalo de variação numérica mais frequente foi de 1 a 10 nematódeos isolados e valores superiores ocorreram exclusivamente em amostras *in natura*. Nematódeos vivos foram encontrados em ambas as amostras. Não se evidenciou a presença de estágios larvares dos nematódeos relacionados aos padrões entre os isolados. Foi identificada a presença em grande maioria de nematódeos de vida livre, bacteriófagos e micófagos, da Ordem Rhabditida, Subordem Rhabditina (55) e Subordem Tylenchina (35), além de um exemplar fitoparasita do Gênero *Helicotylenchus* sp. e um onívoro da

Ordem Dorylaimida. De acordo com a ANVISA RDC nº 14/2014, 80% das amostras higienizadas se encontravam insatisfatórias pela presença de matérias estranhas, e 54% destas continham nematódeos vivos ou mortos. De acordo com a literatura científica, nematódeos de vida livre podem atuar como reservatórios ou vetores de patógenos no meio ambiente, portanto, a sua presença nos alimentos pode representar um risco indireto à saúde do consumidor. A ocorrência de formas evolutivas de nematódeos em amostras de alface confirma a importância da vigilância e controle sanitário desses produtos, além da adoção de critérios precisos de identificação para a adequada aplicação da legislação sanitária e adequada avaliação do potencial de risco à saúde que esses alimentos representam.

Palavras chave: achados morfológicos e microscópicos, larvas, helmintos, vegetais, segurança alimentar sanitária, vigilância em saúde pública.

Abstract

Food is one of the main pathways for the transmission of pathogens to humans, with bacteria and their toxins, viruses and parasites being the main agents related to foodborne diseases. Fresh vegetables are among the largest categories of food contaminated by a wide variety of parasites present in the soil or in irrigation water contaminated, mainly by wastewater. The aims of this work were to assess the occurrence by health hazard nematodes in samples of raw and sanitized green leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) marketed in the city of São Paulo; to develop a morphometric pattern of larval stages of nematodes of medical importance associated with food contamination, and to evaluate the compliance of sanitized lettuce in relation to health legislation regarding the presence of extraneous materials, especially nematodes. Sixty samples of green leaf lettuce from traditional cultivation, 30 raw and 30 sanitized, were analyzed using the eggs and helminths larvae methodology standardized by Matosinhos et al. (2016), modified and verified. The detected nematodes were fixed, observed in a bright field microscope and subjected to analysis of morphological and morphometric characteristics for differential diagnosis and similarity study with larvae patterns of *Strongyloides* spp., *Angiostrongylus* spp. and hookworms. Nematodes were detected in 97% of raw lettuce samples and in 43% of sanitized ones. The most frequent range of numerical variation was 1 to 10 isolated nematodes and higher values occurred exclusively in raw samples. Live nematodes were found in both samples. The presence of larval stages of the nematodes related to the patterns among the isolates was not evidenced. The presence of a large majority of free-living nematodes, bacteriophages and mycophages of the Order Rhabditida, Suborder Rhabditina (55) and Suborder Tylenchina (35) were identified, in addition to a phytoparasite specimen of the genus *Helicotylenchus* sp. and an omnivore of the Dorylaimida Order. According to ANVISA RDC nº 14/2014, 80% of the sanitized samples were unsatisfactory due to the presence of extraneous materials, and 54% of these contained live or dead

nematodes. According to the scientific literature, free-living nematodes can act as reservoirs or vectors of pathogens in the environment, therefore, their presence in food may represent an indirect hazard to consumer health. The occurrence of evolutionary forms of nematodes in lettuce samples confirms the importance of surveillance and sanitary control of these products, in addition to the adoption of precise identification criteria for the appropriate application of sanitary legislation and adequate assessment of the potential health risk that these foods represent.

Keywords: morphological and microscopic findings, helminths, larvae, vegetables, food safety, public health surveillance.

Lista de abreviaturas e siglas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
a	Ânus
adc	Apêndice digitiforme caudal
AFA	Solução de álcool, formol e ácido acético
b	Bulbo
c	Corpo
CVB	Comprimento do vestíbulo bucal
CE	Comprimento do esôfago
COVISA	Coordenação de Vigilância em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo
CPG	Comprimento do primórdio genital
CTC	Comprimento total do corpo
CTM	Comprimento total da muda
CVS	Centro de Vigilância Sanitária
DAC	Distância do ânus à cauda
DPE	Distância do poro excretor
DPGC	Distância do primórdio genital à cauda
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
ea	Entalhe apical
ec	Esôfago claviforme
ef	Esôfago filarioide
er	Esôfago
es	Espícula
est	Estilete
FAO	do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i> (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura)
i	Ístmo
IN	<i>In natura</i>
Kg	Quilograma
L	Litro

LACENS	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LEA	Largura da extremidade anterior
LC	Largura do corpo
L1	Larva de primeiro estágio
L2	Larva de segundo estágio
L3	Larva de terceiro estágio
LM	Largura da muda
LPG	Largura do primórdio genital
M	Molar
mm	Milímetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
pe	Poros excretor
pg	Primórdio genital
PP	Programa Paulista
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
SES	Secretaria de Estado da Saúde
SAA	Secretaria da Agricultura e Abastecimento
SISLAB	Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública
vb	Vestíbulo bucal
VMP	Vegetal minimamente processado
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
µg	Micrograma
µL	Microlitro
%p/p	Percentual peso por peso
°C	Graus Celsius

Lista de Tabelas

Tabela 1: Exemplo de variação morfométrica do isolado de referência (μm)	54
Tabela 2: Exemplo de estudo de similaridade entre espécies do mesmo gênero por aplicação de escore, considerando de uma a (n) larvas casos.....	54
Tabela 3: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas rabditoides (L1) de <i>S. stercoralis</i>	63
Tabela 4: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas rabditoides (L1) de <i>S. venezuelensis</i>	65
Tabela 5: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas rabditoides (L2) de <i>S. venezuelensis</i>	67
Tabela 6: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas filarioides (L3) de <i>S. stercoralis</i>	69
Tabela 7: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas filarioides (L3) de <i>S. venezuelensis</i>	70
Tabela 8: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas rabditoides de ancilostomídeos.....	73
Tabela 9: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas filarioides (L3) de ancilostomídeos.....	74
Tabela 10: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas de primeiro estágio (L1) de <i>A. cantonensis</i>	76
Tabela 11: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas de primeiro estágio (L1) de <i>A. costaricensis</i>	77
Tabela 12: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas de terceiro estágio (L3) de <i>A. cantonensis</i>	79
Tabela 13: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas de terceiro estágio (L3) de <i>A. costaricensis</i>	80
Tabela 14: Recuperação (%) de larvas filarióides de <i>S. venezuelensis</i> em amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) crespa higienizada	81

Tabela 15: Média, desvio padrão, mediana e intervalo de variação do número de nematódeos em amostras de alface crespa <i>in natura</i> e higienizadas	82
Tabela 16: Características morfológicas e morfométricas de larvas rabditoides de <i>S. stercoralis</i> , <i>S. venezuelensis</i> e ancilostomídeos	100
Tabela 17: Características morfológicas e morfométricas de larvas filarioides de <i>S. stercoralis</i> , <i>S. venezuelensis</i> e ancilostomídeos.....	101
Tabela 18: Comparação das características morfológicas e morfométricas de larvas de primeiro estágio (L1) de <i>A. cantonensis</i> e <i>A. costaricensis</i>	102
Tabela 19: Comparação das características morfológicas e morfométricas de larvas de terceiro estágio (L3) de <i>A. cantonensis</i> e <i>A. costaricensis</i>	102
Tabela 20: Estudo de similaridade por entre larvas rabditoides isoladas das amostras de alface e larvas rabditoides de <i>S. stercoralis</i>	105
Tabela 21: Estudo de similaridade entre larvas rabditoides isoladas das amostras de alface e larvas rabditoides de <i>S. venezuelensis</i> ...	106
Tabela 22: Estudo de similaridade entre larvas rabditoides isoladas das amostras de alface e larvas rabditoides de ancilostomídeos. ...	109

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema geral da morfologia do nematódeo(fêmea)	32
Figura 2: Tipos de estilete bucal e de esôfago em fitonematoides	34
Figura 3: Ciclo biológico de <i>Strongyloides stercoralis</i>	37
Figura 4: Ciclo biológico de <i>Ancylostoma</i> spp.....	39
Figura 5: Ciclo biológico de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	41
Figura 6: Ciclo biológico de <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	42
Figura 7: Medidas morfométricas demonstradas em larvas de terceiro estádio de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	52
Figura 8: Medidas morfométricas adicionais, demonstradas em larvas rabditoides L1 de <i>Strongyloides stercoralis</i>	53
Figura 9: Tipos de amostras de alface crespa adquiridas no comércio varejista da cidade de São Paulo (A) <i>in natura</i> e (B) higienizadas.	56
Figura 10: Distribuição das amostras de alface crespa <i>in natura</i> (verde) e higienizadas (vermelho) adquiridas no comércio do município de São Paulo, conforme regiões político- administrativas: norte, sul, centro, leste e oeste.	57
Figura 11: Metodologia de detecção de nematódeos em amostras de alface.	58
Figura 12: Fotomicrografia de larva rabditoide (L1) de <i>S. stercoralis</i>	62
Figura 13: Fotomicrografia de larva rabditoide (L1) de <i>S. venezuelensis</i>	64
Figura 14: Fotomicrografia de larva rabditoide (L2) de <i>S. venezuelensis</i>	66
Figura 15: Fotomicrografia de larva filarioide de <i>S. stercoralis</i>	68
Figura 16: Fotomicrografia de larva filarioide de <i>S. venezuelensis</i>	70
Figura 17: Fotomicrografia de larva rabditoide de ancilostomídeo.....	72
Figura 18: Fotomicrografia de larva filarioide (L3) de ancilostomídeo	74
Figura 19: Fotomicrografia de larva de primeiro estágio (L1) de <i>A.</i> <i>cantonensis</i>	76
Figura 20: Fotomicrografia de larva de primeiro estágio (L1) de <i>A.</i> <i>costaricensis</i>	77

Figura 21: Fotomicrografia de larva de terceiro estágio (L3) de <i>A. cantonensis</i>	79
Figura 22: Fotomicrografia de larva de terceiro estágio (L3) de <i>A. costaricensis</i>	80
Figura 23: Frequência e distribuição de nematódeos isolados nas amostras de alface crespa <i>in natura</i> e higienizadas.	83
Figura 24: Fluxograma com apresentação dos espécimes identificados nas amostras de alface.	84
Figura 25: Exemplos da Ordem Rhabditida, Subordem Rhabditina, Família Rhabditidae.	85
Figura 26: Exemplos da Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Família Panagrolaimidae.	86
Figura 27: Exemplos da Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina. Família Aphelenchoidae.	87
Figura 28: Exemplo de fitonematoide fêmea (juvenil 4) da Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Família Hoplolaimidae, Gênero <i>Helicotylenchus</i> sp.	88
Figura 29: Exemplo da Ordem Dorylaimidae.	89
Figura 30: Exemplos de fêmeas de nematódeos.	90
Figura 31: Exemplos de larvas rabditoides isoladas das amostras sugestivas de <i>Strongyloides</i> spp.	91
Figura 32: Exemplos de larvas rabditoides isoladas das amostras sugestivas de <i>Strongyloides</i> spp.	92
Figura 33: Exemplos de larvas rabditoides isoladas das amostras sugestivas de ancilostomídeo.	93
Figura 34: Exemplos de larvas rabditoides isoladas das amostras sugestivas de ancilostomídeo.	94
Figura 35: Comparação da extremidade anterior de larvas rabditoides de (A) <i>S. stercoralis</i> , (B) <i>S. venezuelensis</i> e (C) ancilostomídeo, e larvas de primeiro estágio (L1) de (D) <i>A. cantonensis</i> e (E) <i>A. costaricensis</i> ,	96

Figura 36: Comparação da extremidade anterior de larvas filarioides de (A) <i>S. stercoralis</i> , (B) <i>S. venezuelensis</i> e (C) ancilostomídeo, e larvas de terceiro estágio (L3) de (D) <i>A. cantonensis</i> e (E) <i>A. costaricensis</i>	97
Figura 37: Comparação da extremidade posterior de larvas rabditoides de (A) <i>S. stercoralis</i> , (B) <i>S. venezuelensis</i> e (C) ancilostomídeo, e larvas de primeiro estágio (L1) de (D) <i>A. cantonensis</i> e (E) <i>A. costaricensis</i>	98
Figura 38: Comparação da extremidade posterior de larvas filarioides de (A) <i>S. stercoralis</i> , (B) <i>S. venezuelensis</i> e (C) ancilostomídeo e larvas de terceiro estágio (L3) de (D) <i>A. cantonensis</i> e (E) <i>A. costaricensis</i>	99
Figura 39: Comparação da extremidade anterior de larvas rabditoides de <i>S. stercoralis</i> (A) , <i>S. venezuelensis</i> (B) e larvas isoladas das amostras	103
Figura 40: Comparação do primórdio genital (pg) de larvas rabditoides de <i>S. stercoralis</i> (A) , <i>S. venezuelensis</i> (B) e larvas isoladas das amostras.	104
Figura 41: Comparação da extremidade posterior de larvas rabditoides de <i>S. stercoralis</i> (A) , <i>S. venezuelensis</i> (B) e larvas isoladas das amostras	104
Figura 42: Comparação da extremidade anterior de larvas rabditoides de ancilostomídeo (A) e larvas isoladas das amostras	107
Figura 43: Comparação da extremidade posterior de larvas rabditoides de ancilostomídeos (A) e larvas isoladas das amostras	108

Índice

1. Introdução	21
2. Revisão Bibliográfica.....	23
2.1. Aspectos Gerais das Doenças Transmitidas por Alimentos	23
2.2. Doenças Parasitárias Transmitidas por Alimentos.....	24
2.3. Importância Sanitária dos Vegetais Folhosos na Transmissão das Helminthíases e a Legislação Vigente	26
2.4. Aspectos Gerais dos Nematódeos.....	30
2.5. Aspectos Gerais dos Principais Gêneros de nematódeos de Importância médica e Veterinária relacionados com a contaminação de alimentos	34
2.5.1. <i>Strongyloides</i> spp.	35
2.5.2. Ancilostomídeos.....	37
2.5.3. <i>Angiostrongylus</i> spp.....	39
2.6. Aspectos Morfológicos e Morfométricos de larvas de nematódeos ..	43
3. Objetivos	45
3.1. Objetivo Geral	45
3.2. Objetivos específicos	45
4. Material e Métodos.....	46
4.1. Obtenção de larvas de nematódeos padrões de interesse médico e estudo morfométrico	46
4.1.1. Obtenção de larvas de <i>Strongyloides stercoralis</i>	46
4.1.2. Obtenção de larvas de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	47
4.1.3. Obtenção de estágios larvários de ancilostomídeos.....	48
4.1.4. Obtenção de estágios evolutivos de <i>A. cantonensis</i> e <i>A.</i> <i>costaricensis</i>	48

4.1.5. Estudo morfológico e morfométrico de larvas de nematódeos de interesse médico e avaliação da similaridade entre espécies do mesmo gênero.....	50
4.2. Detecção, isolamento e diagnóstico diferencial de nematódeos em amostras de alface.....	54
4.2.1. Modificação e verificação da metodologia de detecção de nematódeos em amostra de alface ou Verificação da metodologia modificada de detecção de nematódeos em amostra de alface	55
4.2.2. Amostragem.....	56
4.2.3. Detecção e isolamento de nematódeos em amostras de alface crespa <i>in natura</i> e higienizada, comercializadas na cidade de São Paulo	57
4.2.4. Identificação e diagnóstico diferencial dos nematódeos isolados das amostras	59
4.2.5. Conformidade com a legislação.....	59
4.3. Análise estatística	60
5. Resultados	61
5.1. Caracterização morfológica e morfométrica de padrões de larvas de nematódeos de interesse médico	61
5.1.1. Caracterização morfológica e morfométrica de larvas de <i>S. stercoralis</i> e <i>S. venezuelensis</i>	61
5.1.2. Caracterização morfológica e morfométrica de larvas de ancilostomídeo.....	71
5.1.3. Caracterização morfológica e morfométrica de larvas de <i>A. cantonensis</i> e <i>A. costaricensis</i>	75
5.2. Detecção, isolamento e diagnóstico diferencial de nematódeos em amostras de alface.....	81
5.2.1. Verificação da metodologia de detecção modificada.....	81
5.2.2. Detecção de nematódeos nas amostras de alface	82

5.2.3. Identificação dos nematódeos isolados	83
5.2.4. Diagnóstico diferencial entre larvas de nematódeos padrões e larvas de nematódeos sugestivas de risco detectadas nas amostras de alface	95
5.3. Aplicação da legislação sanitária	109
6. Discussão.....	110
7. Conclusão	130
8. Referências Bibliográficas.....	131
9. Anexos	144

1. Introdução

O consumo regular de vegetais como frutas, verduras e legumes é crescente e amplamente recomendado pelos órgãos de saúde em virtude dos diversos benefícios proporcionados à saúde humana, pois constituem uma importante fonte de fibras, vitaminas, minerais, entre outros nutrientes. No entanto, os vegetais folhosos, consumidos principalmente na forma crua, estão envolvidos com a transmissão de doenças, sobretudo parasitoses intestinais, causadas por diversas espécies de helmintos e protozoários. Esse fato pode estar relacionado à forma de cultivo, seja pelo contato com o solo contaminado ou pela utilização de água de irrigação contendo patógenos, associado às condições inadequadas de higienização dos vegetais. Em vista disso, o monitoramento constante deste tipo de alimento pelos órgãos oficiais se faz necessário, principalmente, em locais com condições precárias de saneamento.

Com o objetivo de monitorar a qualidade sanitária desse tipo de alimento, o Núcleo de Morfologia e Microscopia do Centro de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz, juntamente com o Centro de Vigilância Sanitária (CVS) e a Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde (SES), realizam periodicamente o monitoramento dos vegetais folhosos minimamente processados, dentre outros produtos alimentícios, no âmbito do Programa Paulista de Análise Fiscal de Alimentos (PP). Amostras comercializadas no varejo são coletadas e encaminhadas ao laboratório para verificação de sua conformidade em relação à legislação sanitária quanto aos parâmetros microscópicos, estabelecidos na RDC ANVISA nº 14/2014 (Brasil, 2014), que considera indicativo de risco à saúde o alimento que apresente parasitos associados a agravos a saúde humana. Contudo, a verificação do seu potencial de risco depende diretamente da adequada identificação das formas parasitárias detectadas.

Segundo a literatura científica, dentre os helmintos relatados com maior frequência em vegetais folhosos destacam-se os nematódeos, porém a precisa identificação de espécies de interesse médico em amostras

ambientais é uma ação bastante complexa, devido à diversidade de nematódeos presentes no ambiente, como os fitonematóides e nematódeos de vida livre, em diferentes estágios evolutivos. Em vista disso, o diagnóstico diferencial entre as principais larvas de nematódeos associados a agravos a saúde humana constituiu uma importante abordagem metodológica, aplicada no monitoramento e controle de qualidade desses alimentos, subsidiando as ações da Vigilância Sanitária.

Neste contexto, o presente estudo buscou contribuir com o aprimoramento da identificação de estágios larvares de nematódeos de importância médico-veterinária por meio de análise morfológica e morfométrica de larvas padrões de *Strongyloides stercoralis*, *S. venezuelensis*, ancilostomídeos, *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis* e verificar a ocorrência dessas espécies em amostras de alface *in natura* e higienizadas (prontas para o consumo) comercializadas na cidade de São Paulo. A abordagem proposta constitui uma importante ferramenta para avaliação da qualidade do produto destinado ao consumo humano, com perspectivas de aplicação na prevenção e controle das parasitoses.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Aspectos gerais das doenças transmitidas por alimentos

O alimento é uma das principais vias de veiculação de patógenos ao homem. As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são causadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados. Existem mais de 250 tipos de DTAs, sendo a maioria causada por bactérias, vírus e parasitos. Toxinas e produtos químicos como agrotóxicos ou metais pesados também podem contaminar alimentos e causar doenças (MS, 2010a; MS, 2019).

A ocorrência dessas doenças no mundo vem aumentando significativamente. Diversos fatores têm contribuído para isso, como o aumento das populações, a existência de grupos populacionais vulneráveis, a produção de alimentos em grande escala, a deficiência no controle de qualidade, o aumento da comercialização de alimentos prontos para o consumo, entre outros. Essas infecções podem se apresentar de forma crônica ou aguda, em casos isolados ou com característica de surto, distribuição localizada ou disseminada e com diversas formas clínicas (MS, 2010a).

As DTAs podem acometer indivíduos provocando síndrome caracterizada por anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre. Podem ocorrer afecções intestinais e extraintestinais em diferentes órgãos, como rins, fígado, sistema nervoso central, dentre outros. A gravidade das DTAs difere por fatores intrínsecos do patógeno, como virulência, e do hospedeiro, como idade e estado imunológico (MS, 2010a; MS, 2019).

Apenas uma pequena proporção dessas doenças é confirmada por exames laboratoriais e reportada a órgãos públicos; muitos casos não são diagnosticados. Um levantamento do Centers for Disease Control and Prevention, dos Estados Unidos, estimou em 9,4 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos por ano, com 55.961 hospitalizações e 1.351 mortes causadas por 31 agentes patogênicos principais, como algumas espécies de bactérias, parasitos e vírus, além de 38,4 milhões de

episódios de DTA causadas por agentes inespecíficos, resultando em 71.878 hospitalizações e 1.686 óbitos (Scallan et al., 2011).

No Brasil, de 2009 a 2018, foram relatados 6.903 surtos de DTA, com 122.187 doentes. Em 2018, os agentes etiológicos não foram identificados em 80% dos 597 surtos notificados, e as bactérias e os vírus foram os principais agentes patogênicos associados. Dos alimentos suspeitos em 221 surtos, a água foi a mais incriminada, respondendo por 29% dos casos (MS, 2019).

2.2. Doenças parasitárias transmitidas por alimentos

De acordo com a classificação de risco de transmissão de parasitos por alimentos (Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites) da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e World Health Organization (WHO), carnes de diferentes espécies animais, vegetais, frutas e leite estão entre os principais alimentos relacionados à transmissão de parasitos. Segundo esses órgãos, os vegetais frescos estão entre as maiores categorias de alimentos contaminados por protozoários como *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayetanensis* e *Balantidium coli* e os helmintos *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Ascaris* spp., *Fasciola* spp., *Trichuris trichiura* e *Toxocara* spp. A transmissão de nematódeos como *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Angiostrongylus* spp. também está associada ao consumo de vegetais (FAO/WHO, 2014).

Os helmintos, conhecidos popularmente como vermes, estão entre os agentes infecciosos parasitários mais comuns dos seres humanos nos países em desenvolvimento e são destacados como agentes relacionados a doenças tropicais negligenciadas. Entre eles estão os nematódeos, que incluem os principais vermes intestinais (helmintos transmitidos pelo solo), os filarídeos que causam filariose linfática e oncocercose, e os platelmintos, conhecidos como vermes planos que incluem trematódeos como os esquistossomos e cestódeos como as tênias (Hotez et al., 2008). A

morbimortalidade associada à carência de saneamento básico e práticas inadequadas de higiene acomete em especial as crianças, nas quais as helmintíases causam desnutrição, atraso no crescimento, retardo intelectual e deficiências cognitivas (WHO, 2020).

As parasitoses intestinais têm uma ampla distribuição mundial e ainda representam um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, inclusive no Brasil, onde há condições que favorecem a transmissão, como climas quentes e úmidos, baixa condição socioeconômica, alta densidade populacional, desnutrição, condições inadequadas de higiene e serviços públicos de saneamento básico precários. Os parasitos intestinais podem ser patogênicos ou não patogênicos em pacientes imunocompetentes, contudo, os não patogênicos podem estar associados a doenças graves em pacientes imunocomprometidos (Adedayo e Nasiro, 2004; MS, 2010b; Cunha, 2013).

Cerca de 1,5 bilhão de pessoas no mundo estão infectadas com helmintos transmitidos pelo solo ou geohelmintos, que causam infecções humanas por meio do contato com solo contaminado em áreas sem saneamento ou pelo consumo de vegetais e água contaminados com dejetos humanos ou animais. *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e os ancilostomídeos (*Necator americanus* ou *Ancylostoma duodenale*) são as principais espécies de importância mundial (Pullan et al., 2014; Amoah et al., 2017; WHO, 2020).

Diversos estudos nacionais e internacionais reportam a presença de estruturas parasitárias associadas a agravos a saúde humana em vegetais como salsa, coentro, cebolinha, agrião, hortelã, alface, alho-poró, rúcula, entre outras. Foram detectados ovos e larvas de diversas espécies de helmintos, entre eles ancilostomídeos, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Trichostrongylus* spp., *Toxocara* spp., *Enterobius vermicularis*, *Echinococcus multilocularis*, *Taenia* spp., *Hymenolepis nana*, *Dicrocoelium dendriticum* e *Strongyloides stercoralis* (Oliveira e Germano, 1992; Soares e Cantos, 2006; Abougrain et al., 2010; Shahnazi e Jafari-Sabet, 2010; Said,

2012; Adenusi et al., 2015; Balarak et al., 2016; Lass et al., 2016; Silva et al., 2018).

A contaminação dos vegetais por parasitos pode ocorrer em diversas etapas da sua produção, desde o plantio, colheita, comercialização até o seu consumo. No entanto, a qualidade da água de irrigação, o tipo de adubação e a presença de animais na propriedade são algumas das principais possibilidades (Chaidez et al., 2005; Almeida et al., 2013; Ferreira et al., 2018). As diferentes formas evolutivas aderem-se a superfície dos vegetais e podem ser ingeridas quando estes não são adequadamente cozidos, lavados ou descascados (Marouelli et al., 2014; WHO, 2020).

Apesar dos riscos, o consumo mundial de frutas e verduras é crescente e intensamente recomendado pela OMS e outros órgãos de saúde por conterem diversos elementos essenciais à saúde e constituírem importante fonte de fibras alimentares, vitaminas, minerais, elementos fitoquímicos, e compostos bioativos, além de serem considerados pouco calóricos. Pesquisas constantemente comprovam os benefícios do consumo diário desses alimentos para o adequado funcionamento do corpo humano, e a baixa ingestão de frutas e vegetais está entre os principais fatores de risco para a mortalidade no mundo, principalmente relacionados à desnutrição e as doenças crônicas não transmissíveis como as cardiovasculares, respiratórias e o câncer (OMS, 2006; FAO, 2017).

2.3. Importância sanitária dos vegetais folhosos na transmissão das helmintíases e a legislação vigente

Dentre as hortaliças, a alface (*Lactuca sativa* L.) destaca-se como a mais popular e consumida no Brasil e no mundo devido ao sabor agradável, facilidade de preparo e grande diversidade de tipos e cultivares, sendo a alface crespa da variedade Verônica a preferida e mais consumida (Henz e Suinaga, 2009; Maldonade et al., 2014). Além disso, é altamente nutritiva por ser uma importante fonte de sais minerais, cálcio e vitaminas, especialmente a A, e pelo alto teor de fibras que ajuda a regular o funcionamento do trato gastrointestinal (Ziech et al., 2014; USDA, 2020). É cultivada em todo

território brasileiro, predominantemente no estado de São Paulo, em regiões próximas a áreas metropolitanas, como o cinturão verde de São Paulo, com produção que ultrapassa 200 mil toneladas por ano (Figueiredo, 2015).

O cultivo da alface é realizado tradicionalmente em canteiros de terra, onde o vegetal fica em contato com o solo. A adubação orgânica, muitas vezes constituída de fezes de diversos animais e irrigação com água de rios, córregos e lagos sem tratamento favorecem as contaminações. Por ser consumida geralmente na forma crua, o único tratamento entre o cultivo e o consumo da alface é a higienização, que se realizada de forma inadequada propicia a transmissão de patógenos (Mogharbel e Masson, 2005).

Entre as formas parasitárias de helmintos isolados de amostras de alface destacam-se ovos de *Ancylostoma* sp., *Ascaris lumbricoides*, *Hymenolepis nana*, *Trichuris trichiura*, *Trichostrongylus* spp., *Taenia* spp., *Strongyloides* sp., *Enterobius* sp., *Toxocara* sp., além de larvas de *Strongyloides stercoralis*, ancilostomídeos e de *Rhabditis*. Também foram reportados vermes e larvas de vida livre (Oliveira e Germano, 1992; Guimarães et al., 2003; Traviezo-Valles et al., 2004; Soares e Cantos, 2006; Quadros et al., 2008; Abougrain et al., 2010; Shahnazi e Jafari-Sabet, 2010; Neres et al., 2011; Gregório et al., 2012; Said, 2012; Ragazzi, 2012; Silva et al., 2013; Pacifico et al., 2013; Oliveira e Perez, 2014; Adenusi et al., 2015; Silva et al., 2016; Terto et al., 2014; Luz et al., 2017; Silva et al., 2018).

No Brasil, os vegetais folhosos são predominantemente comercializados na forma *in natura*, devendo ser higienizados antes do consumo, mas é crescente o consumo dos vegetais minimamente processados devido à praticidade, pois são comercializados já higienizados e embalados. Porém, a manipulação inadequada ou ausência de procedimentos corretos de sanitização dos vegetais e dos equipamentos utilizados no beneficiamento podem comprometer a qualidade e segurança desses alimentos (Maistro, 2001).

A Resolução nº 42, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo (São Paulo, 2009), determina normas técnicas para

produtos hortícolas minimamente processados e frescos cortados quanto ao processamento, rotulagem, transporte e comercialização e define como hortaliça *in natura* ou fruta *in natura* todo alimento de origem vegetal que é consumido em seu estado natural, e como produtos minimamente processados os produtos hortifrutícolas higienizados e embalados que foram submetidos a processos técnicos, preservando suas características sensoriais naturais, tornando-os prontos para o consumo ou para preparo culinário.

Os critérios técnicos recomendados para o processamento desses produtos incluem a avaliação e seleção de matérias primas, insumos e embalagens; transporte, recepção e estocagem da matéria prima; toalete e higienização dos produtos, bem como dos equipamentos; controle da qualidade da água utilizada no processamento e limpeza; controle da desinfecção; determinação da implementação de procedimentos padrões de higiene operacional; controle da secagem e da utilização de aditivos, coadjuvantes e sanitizantes; manejo e destinação dos resíduos vegetais; adequação dos manipuladores; controle da estocagem refrigerada e adoção de fluxo operacional (São Paulo, 2009).

No caso da alface higienizada, o fluxo de produção envolve diversas etapas de seleção, lavagem e higienização que minimizam os riscos de contaminações. Na primeira etapa de recebimento e conferência do produto é verificado o padrão de qualidade sensorial desejado e incidência de pragas; na segunda etapa de seleção e pré-lavagem, o vegetal é desfolhado e lavado em água; na terceira etapa ocorre a higienização, onde vegetal é lavado novamente e desinfetado; na quarta etapa é retirada a água proveniente dos processos de higienização por centrifugação; na quinta etapa é feita a inspeção visual e acondicionamento da alface na embalagem com o rótulo de alface higienizada; na sexta etapa ocorre a selagem da embalagem e, por fim, na sétima etapa é feito o armazenamento refrigerado em câmara frigorífica a temperatura de 5°C (MAPA, 2018).

A vigilância dos alimentos e água no Brasil é realizada pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs), subordinados às

Secretarias Estaduais de Saúde e pelo Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (SISLAB). No estado de São Paulo essa vigilância é realizada pelo Centro de Vigilância Sanitária (CVS) e pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), da Coordenadoria de Controle de Doenças, da Secretaria de Estado da Saúde (SES), em conjunto com grupos regionais de vigilância Sanitária (GVS), laboratórios regionais do IAL e a Coordenação de Vigilância em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo (COVISA). Estes órgãos vêm desenvolvendo desde 1995 o Programa Paulista de Análise Fiscal de Alimentos (PP), com o objetivo de monitorar a qualidade sanitária dos produtos alimentícios expostos no comércio e aplicar a legislação sanitária, sobre infrações encontradas nos produtos, entre outras ações.

Anualmente para o PP são determinados os produtos alimentícios que devem ser monitorados segundo os critérios de potencial risco à saúde, amplitude do consumo e participação nos hábitos alimentares nacionais e regionais do estado (CVS, 2020). Dentre os alimentos monitorados com maior frequência ao longo dos anos, encontram-se os vegetais folhosos higienizados ou minimamente processados, devido à possibilidade desses alimentos considerados prontos para o consumo e consumidos na forma crua veicularem patógenos como bactérias e parasitas por falhas durante seu processamento.

A Resolução da Diretoria Colegiada RDC ANVISA/MS nº 14 (Brasil, 2014) é a legislação sanitária que dispõe sobre a presença de matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Esse regulamento define matéria estranha como qualquer material não constituinte do produto associado a condições ou práticas inadequadas na produção, manipulação, armazenamento ou distribuição e diferencia as matérias estranhas de acordo com o seu potencial de risco à saúde. São consideradas matérias estranhas indicativas de riscos à saúde humana aquelas capazes de veicular agentes patogênicos para os alimentos e/ou de causar danos ao consumidor, dentre elas algumas espécies de insetos (baratas, formigas e moscas), roedores, outros animais (morcegos e pombos), excrementos de animais e parasitas,

helmintos e protozoários, em qualquer fase de desenvolvimento, associados a agravos a saúde humana. As demais matérias estranhas que não representam risco à saúde são consideradas indicativas de falhas das Boas Práticas, que são os procedimentos que devem ser adotados a fim de garantir a qualidade higiênico-sanitária e a conformidade dos produtos alimentícios com os regulamentos técnicos. Não há limites de tolerância de matérias estranhas específicos para vegetais minimamente processados segundo a resolução, portanto esse tipo de alimento é enquadrado na categoria alimentos em geral, onde há limites de tolerância apenas para a presença de areia (1,5% de areia ou cinzas insolúveis em ácido) e de ácaros mortos (máximo de 5 na alíquota analisada de acordo com as recomendações das metodologias).

Em geral, as metodologias de avaliação da contaminação de vegetais por helmintos são derivadas das metodologias de análises clínicas, com processos de sedimentação espontânea e/ou centrifugação, e incluem a lavagem dos vegetais com soluções que promovem o destacamento de ovos e larvas. A metodologia padronizada por Matosinhos et al. (2016) para detecção de ovos e larvas de helmintos em alface e rúcula tem sido utilizada apresentando boa recuperação, porém, devido à grande diversidade de espécies presentes no solo, a identificação desses organismos, em especial das formas larvares de nematódeos, é bastante complexa, tornando-se necessária a adoção de métodos de maior especificidade como a análise morfométrica, a fim de auxiliar na caracterização e diferenciação dos nematódeos.

2.4. Aspectos gerais dos nematódeos

Os nematódeos (Filo Nematoda) constituem um grupo altamente diverso, abundante e especializado de animais multicelulares, que vivem em ambientes variados como oceanos, mares e também no solo, desde que haja umidade suficiente para sua sobrevivência (De Ley, 2006; Ferraz e Brown, 2016). São mais de 15.000 espécies descritas, sendo a maioria de vida livre, porém há espécies parasitas tanto de animais vertebrados e

invertebrados (zooparasitas), quanto de plantas (fitoparasitas) (Hotez et al., 2008; Ferraz, 2018). Cerca de 26% dos gêneros habitam o solo com diferentes funções ecológicas e hábitos alimentares. Entre os de vida livre que se alimentam de organismos microscópicos há os bacteriófagos que se alimentam de bactérias, os micófagos, que se alimentam de fungos, os protozoófagos, que se alimentam de protozoários, os algívoros, que se alimentam de algas, os aligoquetófagos, que se alimentam de anelídeos oligoquetas e os nematófagos, predadores que se alimentam de outros nematódeos (Ritzinger et al., 2010; Ferraz e Brown, 2016).

São organismos tubulares alongados, com variações quanto à forma e tamanho, podendo ser subcilíndricos ou fusiformes, normalmente filiformes, de diâmetro geralmente constante, afinando-se gradualmente na extremidade anterior e de forma variável na extremidade posterior, de movimento geralmente serpentina, por ondulação dorsoventral (Figura 1). A cutícula recobre externamente o corpo e pode ser lisa ou apresentar estrias transversais ou longitudinais. Apresentam variações quanto ao tipo de cavidade bucal, formato e constituição do esôfago, de acordo com hábitos alimentares. O ciclo de vida dos nematódeos compreende ovo, três ou quatro estágios juvenis (larvários) onde ocorrem as trocas de cutícula ou ecdises que possibilitam o crescimento e a forma adulta (verme) (Ferraz, 2018; Ferraz e Brown, 2016).

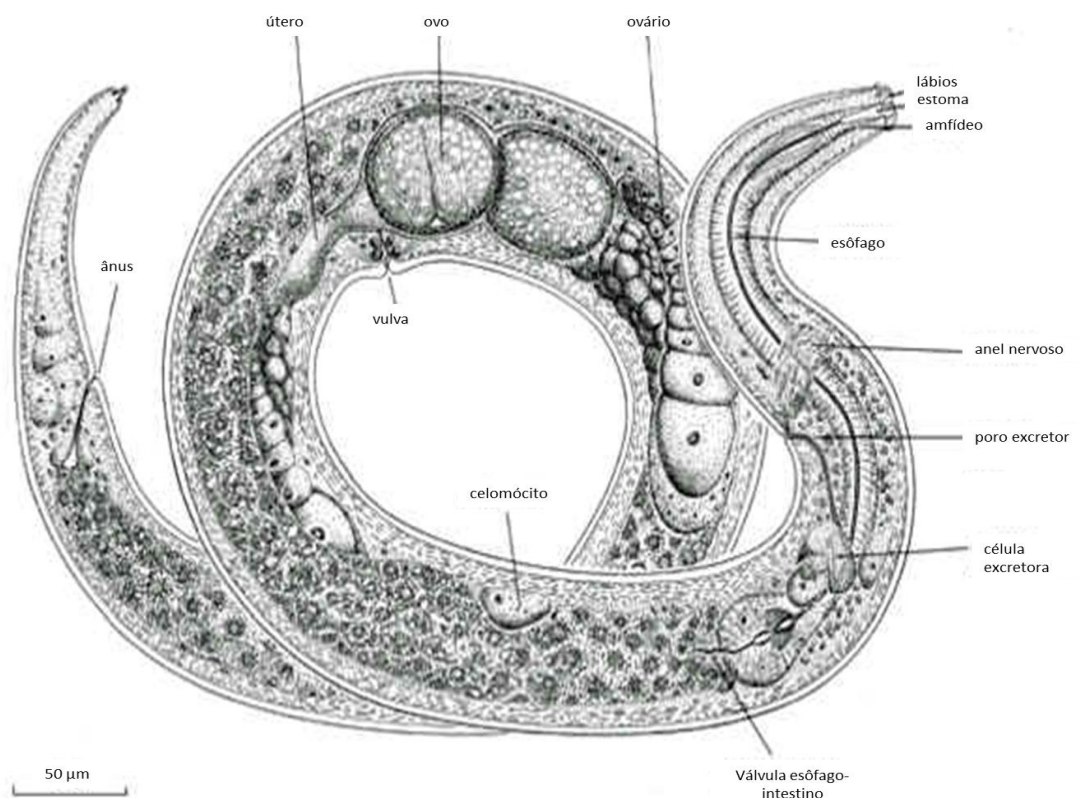


Figura 1: Esquema geral da morfologia do nematódeo(fêmea)

Fonte: <http://nemaplex.ucdavis.edu/images/metazo12.jpg>

A sobrevivência desses organismos no solo depende principalmente da umidade, umidade relativa e fatores ambientais como clima, fisiologia das plantas entre outros. Muitas espécies desenvolveram diversas formas de adaptação às mudanças ambientais, como a dormência ou diapausa, a agregação ou formação de larva “dauer”, a quiescência e anidrobiose, onde por meio de estágios temporários de inatividade lhes permitem maior resistência a condições adversas, como falta de água, falta de oxigênio ou exposição a temperaturas muito baixas, contribuindo para a longevidade de muitas espécies. Alterações em seu metabolismo e estratégias reprodutivas como mudança de sexo e taxa de reprodução também podem melhorar a sobrevivência de novas gerações. A análise da presença de grupos funcionais de nematódeos de acordo com os hábitos alimentares, sua abundância e diversidade no solo possibilita que os mesmos sejam utilizados como bioindicadores das condições do uso da terra em estudos de sustentabilidade (Ritzinger et al., 2010; Ferraz e Brown, 2016)

Entre os nematódeos presentes no solo que se destacam por sua importância sanitária e econômica estão os fitoparasitas ou fitonematoides, que parasitam plantas e causam prejuízos significativos à agricultura (Ferraz e Brown, 2016; Ferraz, 2018), e as espécies parasitas de importância médica ou veterinária que, por apresentarem alguma fase de seu ciclo de vida no solo, geralmente entre as mudanças de fases larvárias e transferência de hospedeiros, favorecem a contaminação de alimentos, solo e água (Bethony, 2006; Amoah et al., 2017). Alguns nematódeos de vida livre também podem apresentar importância sanitária ao conter micro-organismos em seu interior. É o caso das espécies microbívoras, como o *Caenorhabditis elegans*, que vivem habitualmente em matéria orgânica em decomposição, terra úmida, água doce ou salgada e que podem albergar bactérias e protozoários, atuando como veiculadores de patógenos (Rasch et al., 2016; Kenney et al., 2005).

Os fitonematoides são parasitas de tecidos vegetais, principalmente raízes, que comprometem a sanidade e a qualidade dos produtos agrícolas, promovendo importantes danos e perdas à produção de diversas culturas. São organismos microscópicos, que medem em média de 0,2 – 3,0 mm de comprimento, com raras exceções que podem atingir 12 mm, o que dificulta o diagnóstico e a adoção de medidas de controle nas plantas infectadas. A maioria das espécies apresenta corpo filiforme, porém é possível encontrar alterações de formas que, segundo Ferraz e Brown (2016), são denominadas de “fêmeas obesas com formatos aberrantes”. A distinção desse grupo com os demais nematódeos é feita por meio da verificação da presença de um órgão em forma de estilete na cavidade bucal que possui importantes funções durante o processo de alimentação, como a injeção de substâncias no citoplasma das células dos vegetais e a ingestão dos nutrientes. O estilete bucal apresenta formas e tamanhos diferentes entre os gêneros, conforme o modo de parasitismo e o hábito alimentar (Figura 2) Os fitonematoides podem ser endoparasitas (sedentários ou migradores), semiendoparasitas e ectoparasitas, e podem parasitar tanto as partes aéreas das plantas como as raízes. *Radopholus*, *Pratylenchus*, *Meloidogyne*,

Globodera e *Heterodera* são alguns importantes gêneros de fitonematóides endoparasitas. *Rotylenchulus* e *Tylenchulus* são os dois gêneros semiendoparasitas mais importantes mundialmente, e *Criconemoides xenoplax*, *Hemicycliophora arenaria*, *Belonolaimus longicaudatus* e *Xiphinema index* são as espécies ectoparasitas mais relevantes (Ferraz e Brown, 2016). De ocorrência em hortaliças destacam-se os nematódeos dos gêneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Ditylenchus* e *Scutellonema* (Pinheiro, 2017).

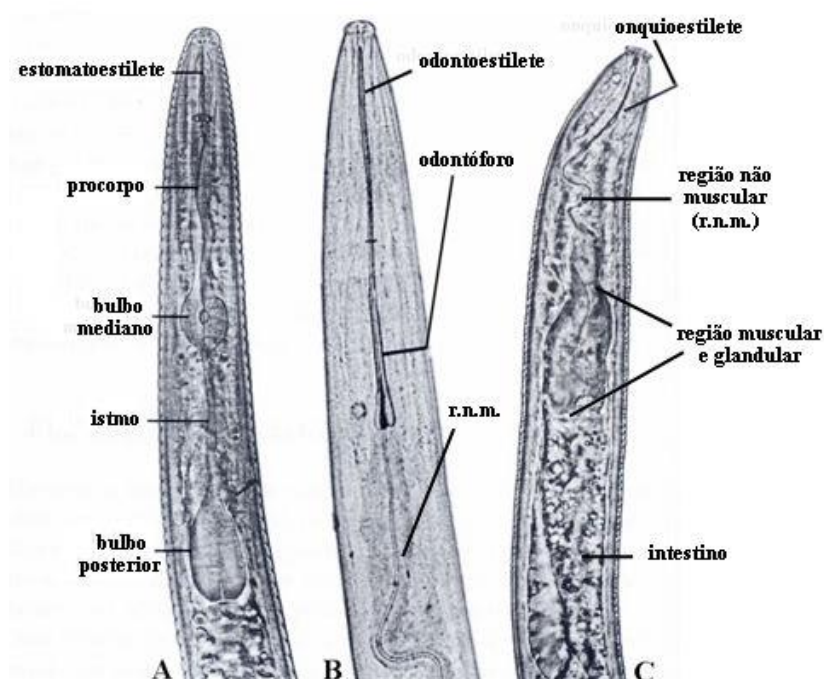


Figura 2: Tipos de estilete bucal e de esôfago em fitonematóides (adaptado de W. F. Mai e H. H. Lyon)

Fonte: Ferraz & Brown, 2016

2.5. Aspectos gerais dos principais gêneros de nematódeos de importância médica e veterinária relacionados com a contaminação de alimentos

De importância médica e/ou veterinária, com potencial de contaminação de alimentos por meio do contato direto com o solo, sobressaem-se os nematódeos dos gêneros *Strongyloides* sp., os ancilostomídeos e nematódeos do gênero *Angiostrongylus* sp. Larvas de

Strongyloides sp. e de *Ancylostoma* sp. já foram detectadas em hortaliças analisadas em diferentes cidades brasileiras como Florianópolis (Soares e Cantos, 2006), Caruaru (Esteves e Figueirôa, 2009), Imperatriz (Oliveira et al., 2016), Crato (Silva et al., 2018), Anápolis (Neres et al., 2011), Santo Antônio de Jesus (Silva et al., 2016), Serra Talhada (Terto, 2014), entre outras.

2.5.1. *Strongyloides* spp.

Os nematódeos do gênero *Strongyloides* (Grassi, 1879) pertencem a Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem Rhabditina, Superfamília Strongyloidoidea e família Strongylidae (Ferris, 2020; De Ley e Blaxter, 2004). São espécies parasitas de vertebrados como anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos extremamente comuns e generalizados. Apresentam um ciclo de vida complexo com formas sexuais de vida livre e formas hermafroditas parasitárias do sistema gastrointestinal (Anderson et al, 2009). No homem, esses nematódeos são responsáveis por causarem estrongiloidíase, uma doença parasitária intestinal de distribuição mundial heterogênea e endêmica em algumas regiões tropicais e subtropicais como Ásia, África e América do Sul, incluindo o Brasil (Schar et al., 2013; Sudré et al., 2006). O principal agente etiológico da estrongiloidíase humana no mundo é o *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876), porém outra espécie já foi associada à infecção no homem, como *S. fuelleborni* (Von Linstow, 1905) na África e em Nova Guiné (Liu & Weller, 1993; Sudré et al., 2006; Sidiqi e Berk, 2001).

Em geral a maioria das infecções crônicas por *Strongyloides* sp. é assintomática ou apresenta sintomas gastrointestinais leves como diarreia, desconforto abdominal, náusea, urticária, anorexia, perda de peso e inchaço abdominal. Os casos graves estão normalmente associados à carga parasitária e ao estado imunológico do paciente e causam uma forma de estrongiloidíase pulmonar com sintomas respiratórios que incluem tosse e falta de ar. Pacientes imunossuprimidos ou em tratamento com corticoides tem maior risco de desenvolverem hiperinfecção e apresentarem formas

graves com pneumonia, meningite, bacteremia e até mesmo casos fatais (Schar et al., 2013; Luvira et al., 2014; De Paula et al., 2019).

A infecção ocorre principalmente por meio da penetração de larvas filarióides infectantes (L3) pela pele íntegra, seguida por um ciclo cardiopulmonar culminando no parasitismo intestinal com eliminação de larvas rabditoides nas fezes. Somente as fêmeas são parasitas, elas se localizam no intestino delgado e formam larvas rabditoides (L1) por partenogênese. No ambiente essas larvas podem originar machos ou fêmeas de vida livre, que se reproduzem sexuadamente e geram larvas rabditoides que se desenvolvem em filarióides infectantes. Em situações extremas pode ocorrer a autoinfecção, onde larvas rabditoides podem se transformar em filarióides infectantes no próprio intestino do hospedeiro e migrar pela mucosa para a rede venosa, reiniciando o ciclo pulmonar por anos. A ocorrência de transmissão oral de larvas infectantes também é possível (Siddiqui e Berk, 2001; Sudré et al., 2006) (Figura 3).

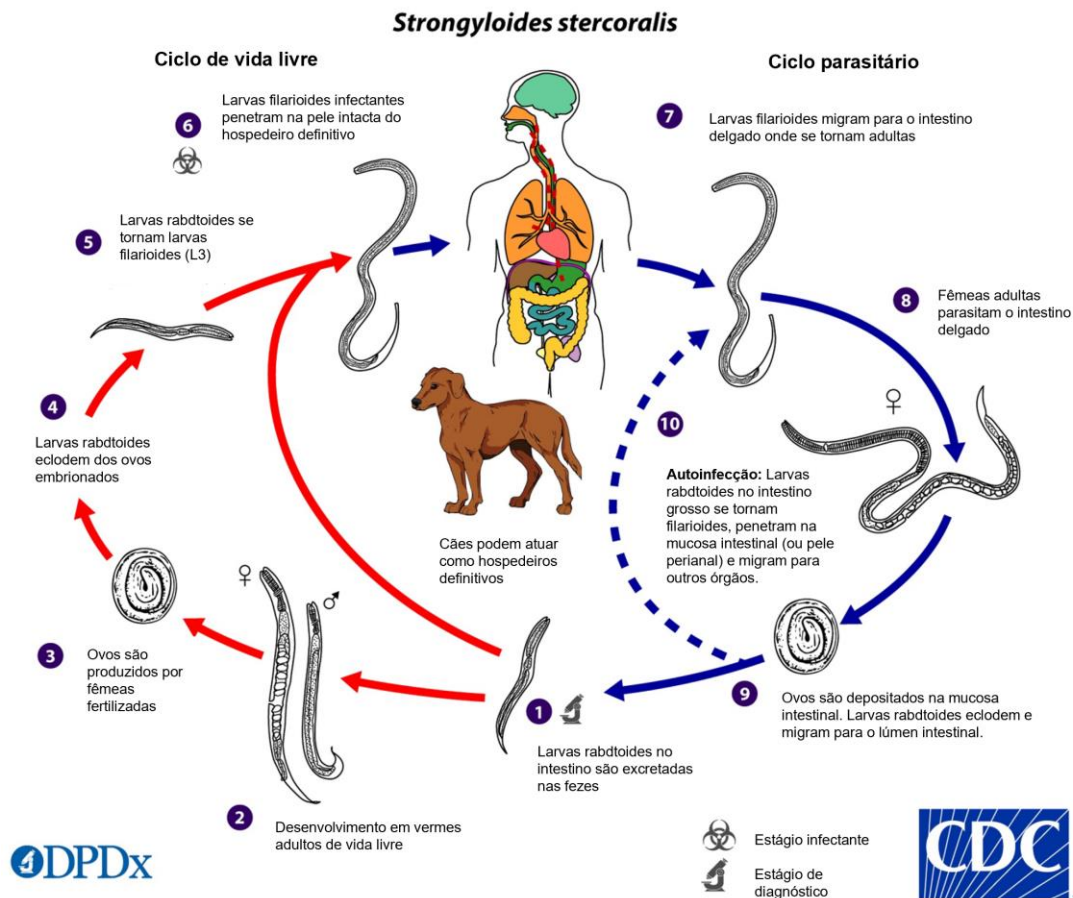


Figura 3: Ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis*

Fonte: https://www.cdc.gov/dpdx/strongyloidiasis/modules/Strongyloides_LifeCycle_19.jpg (adaptado para a língua portuguesa pela autora)

2.5.2. Ancilostomídeos

Os ancilostomídeos pertencem à Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem Rhabditina, Superfamília Strongyloidea, família Ancylostomatidae (Ferris et al., 2020, De Ley e Blaxter, 2004). Dentre as diversas espécies de ancilostomídeos, três são os principais agentes etiológicos das ancilostomoses humanas: *Ancylostoma duodenale* (Dubini, 1843), *Necator americanus* (Stiles, 1902) e *Ancylostoma ceylanicum* (Loss, 1911) (Rey, 2001). Entre as espécies antropofílicas, *N. americanus* é a mais comum em todo o mundo, enquanto *A. duodenale* é mais restrito geograficamente. Três espécies de ancilostomídeos zoonóticos também podem infectar humanos como o *A. ceylanicum*, que tem os canídeos e felídeos domésticos e silvestres como hospedeiros definitivos, *A. caninum*,

parasita de cães que pode provocar enterite eosinofílica humana e *A. braziliense*, que causa larva migrans cutânea (Hotez et al., 2004).

Cerca de 439 milhões de pessoas estão infectadas com ancilostomídeos em todo o mundo, com a maioria dos casos encontrados nas regiões em desenvolvimento do Sul, Sudeste e Leste da Ásia, África Subsaariana, América Latina e Caribe (Hotez et al., 2014; Pullan et al., 2014). Podem-se encontrar indivíduos tanto portadores assintomáticos e sadios como sintomáticos com casos agudos ou crônicos, com diversos graus de infestação e gravidade (Pessoa, 1981). A ancilostomose caracteriza-se principalmente por anemia progressiva, decorrente da deficiência de ferro e suas consequências, provocada pela ação dos vermes ao fixarem seu aparelho bucal na mucosa e submucosa intestinal para extraírem sangue. Podem ocorrer também perturbações cutâneas, pulmonares e gastrointestinais, assim como depressão física e mental (Pessoa, 1981; Rey, 2001).

Assim como outros nematódeos parasitos, os ancilostomídeos apresentam um ciclo biológico com duas fases, a primeira de vida livre, que se desenvolve no meio exterior e não necessita de hospedeiros intermediários e a segunda, parasitária, que se desenvolve obrigatoriamente no hospedeiro definitivo. Ovos de *Ancylostoma* spp. (Lane, 1916) podem ser eliminados no solo juntamente com materiais fecais de humanos, canídeos e felídeos domésticos ou silvestres. Sob condições favoráveis de temperatura e umidade eliminam larvas rabditoides em poucos dias, que se nutrem de matéria orgânica e bactérias presentes no solo até se transformarem em larvas de 2º estágio (L2), também rabditoides e em seguida em larvas de 3º estágio (L3), filarióides, infectantes para o homem. As L3 infectantes, apesar de não se alimentarem por apresentarem uma cutícula externa que suprime a cavidade oral, podem permanecer ativas na superfície do solo por semanas ou meses e infectam o homem por meio de penetração ativa através da pele, conjuntiva e mucosa, ou passivamente, por via oral. Na sequência seguem pela circulação sanguínea por capilares pulmonares, até a laringe e a faringe e, deglutidas, se instalam no intestino, onde ocorrerá a

transformação final em vermes adultos, machos e fêmeas (Rey, 2001; Leite, 2005) (Figura 4).

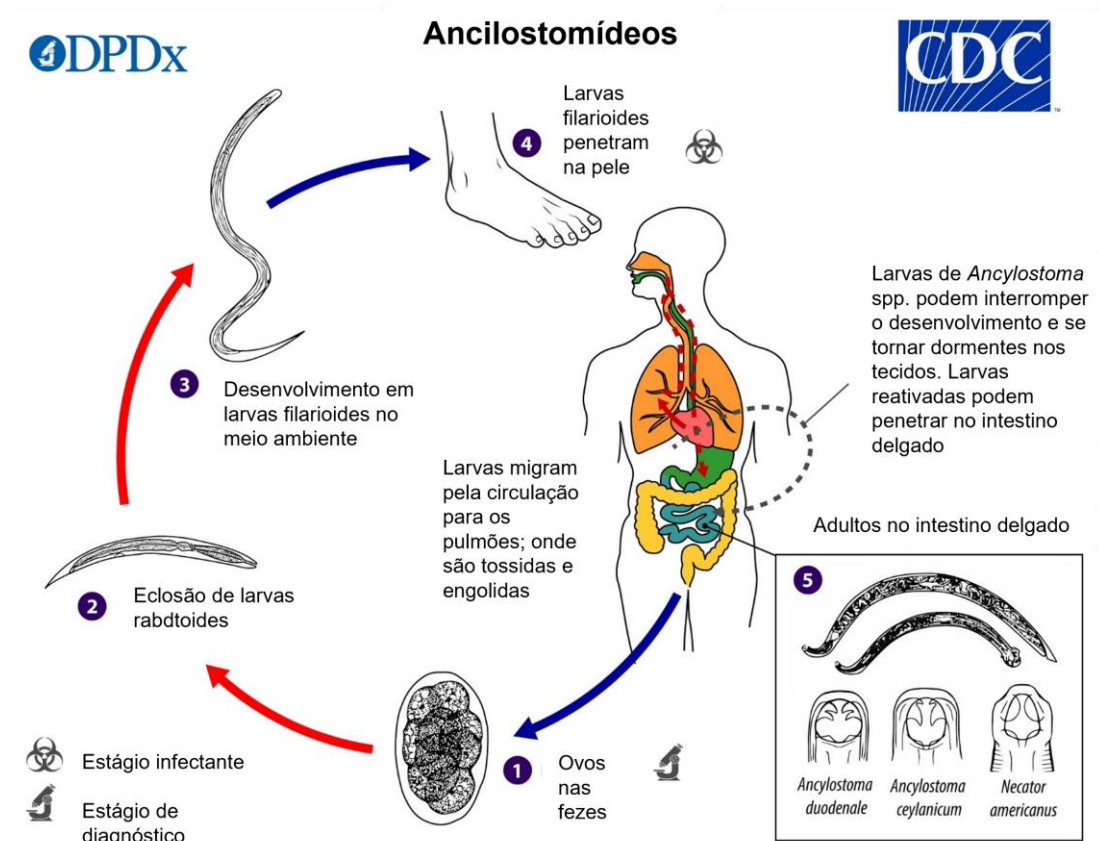


Figura 4: Ciclo biológico de *Ancylostoma* spp.

Fonte: https://www.cdc.gov/dpdx/hookworm/modules/Hookworm_LifeCycle_lg.jpg (adaptado para a língua portuguesa pela autora)

2.5.3. *Angiostrongylus* spp.

Os nematódeos do gênero *Angiostrongylus* (Kamensky, 1905) pertencem ao filo Nematoda, classe Chromadorea, ordem Rhabditida, subordem Rhabditina, superfamília Strongyloidea e família Metastrongylidae (De Ley e Blaxter, 2004; Ferris, 2020). Neste gênero está agrupada uma variedade de vermes parasitas de pulmões e vasos sanguíneos de roedores, felídeos, canídeos e insetívoros, cujo ciclo de vida envolve os gastrópodes como hospedeiros intermediários (Anderson et al., 2009).

Os hospedeiros definitivos infectados por espécies de *Angiostrongylus* liberam larvas de primeiro estágio nas suas fezes e podem infectar lesmas e/ou caracóis aquáticos ou terrestres por ingestão ou

penetração no seu tegumento. Estes, por sua vez, eliminam larvas infectantes de terceiro estágio em suas fezes ou secreções que podem infectar novos hospedeiros. A transmissão também pode envolver a ingestão de hospedeiros paratênicos como crustáceos, sapos e lagartos (Anderson et al., 2009; Valente et al., 2018; Spratt, 2015; Wang et al., 2008).

Esses nematódeos são considerados zoonóticos quando infectam humanos por meio de ingestão accidental ou deliberada de moluscos ou crustáceos infectados por duas espécies principais, *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, responsáveis por um quadro de angiostrongilíase neurológica e abdominal respectivamente. Há diversos relatos de angiostrongilíase em humanos, principalmente em países americanos, inclusive no Brasil (Valente et al., 2018; Maldonado Jr et al., 2010, Spratt, 2015). Geralmente as pessoas se infectam ao manipularem os moluscos ou ao consumirem alimentos crus ou mal cozidos contendo larvas de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* (Wang et al., 2008; Romero-Alegría et al., 2014). *Achatina fulica* (gigante africano) é a principal espécie de caramujo relacionada à veiculação desses nematódeos (Thiengo et al., 2010; Song et al., 2016; Dumidae et al., 2019) e o risco de contaminação de alimentos por esses moluscos se torna ainda maior, visto que eles se alimentam de vegetais como frutas e verduras e se adaptaram a sobreviver em diversos ambientes urbanos e rurais, em contato próximo à população (Thiengo et al., 2007).

Nas Américas *Rattus norvegicus* (ratazana) e *Rattus rattus* (rato de telhado) são os principais hospedeiros das formas adultas de *A. cantonensis* (Valente et al., 2018). No homem, assim como no rato, larvas infectantes de *A. cantonensis* quando ingeridas migram do intestino ao cérebro pela circulação, se alojam nas meninges e eventualmente morrem, causando uma intensa reação inflamatória (Morassutti et al., 2014) (Figuras 5). Os sintomas são variáveis, incluindo dores de cabeça, rigidez na nuca, parestesia, vômito, febre, náuseas, distúrbios visuais, entre outros. Os efeitos neurológicos podem ser graves com o desenvolvimento de um quadro de meningite eosinofílica, dependendo da quantidade de larvas ingeridas, sua movimentação e localização. Ocasionalmente pode levar ao

estado de coma ou até mesmo ao óbito (Wang et al., 2008; Murphy e Johnson, 2013; Cowie, 2017).

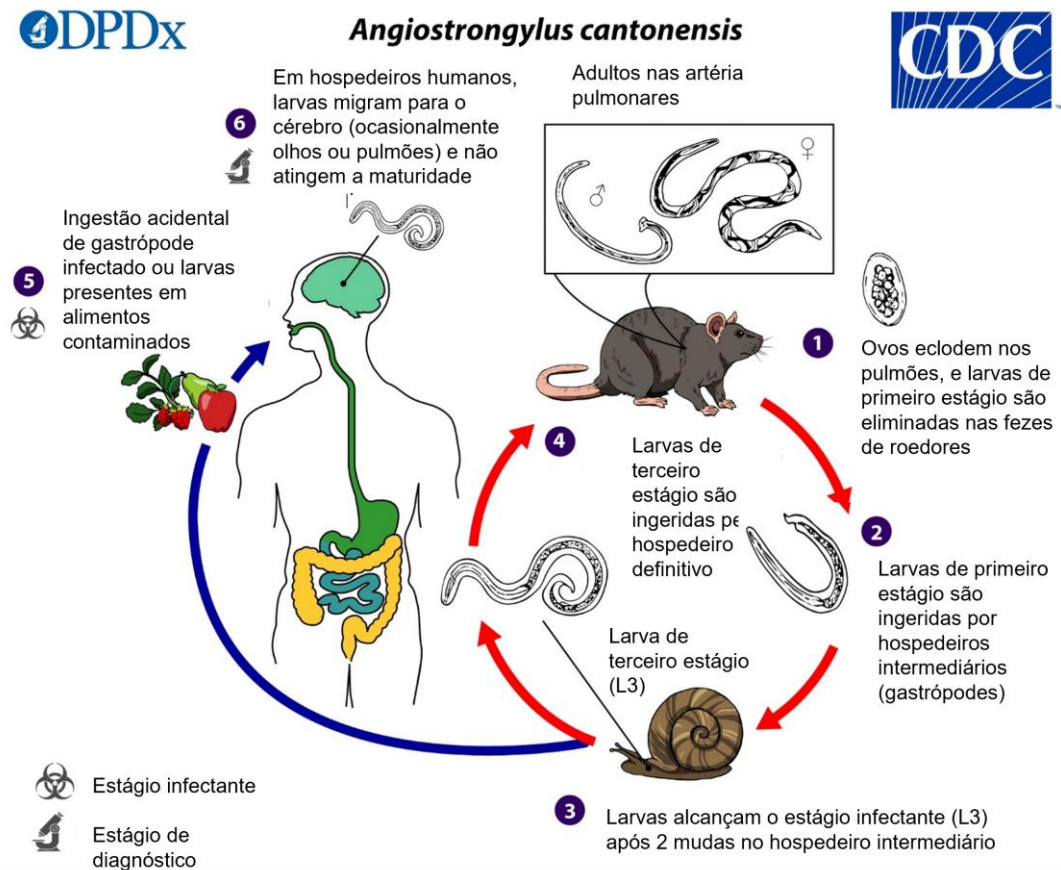


Figura 5: Ciclo biológico de *Angiostrongylus cantonensis*

Fonte:

https://www.cdc.gov/dpdx/angiostrongyliasis_can/modules/Angio_cant_LifeCycle_lg.jpg (adaptado para a língua portuguesa pela autora)

Diversos casos de meningite eosinofílica provocada por *A. cantonensis* já foram diagnosticados no Brasil (Espírito-Santo et al., 2013; Morassutti et al., 2014). Além de casos humanos, já foram encontrados hospedeiros definitivos (roedores) e Intermediários (moluscos) infectados por *A. cantonensis* demonstrando o estabelecimento de biocenose em diferentes regiões do país (Cognato et al., 2013; Maldonado Júnior et al., 2010; Mota et al., 2020).

Larvas infectantes de *A. costaricensis* alojam-se nas artérias mesentéricas do homem, assim como de outros hospedeiros definitivos,

onde as fêmeas depositam seus ovos. A presença dos ovos e larvas induz um quadro de angiostrongilíase abdominal, com uma intensa reação inflamatória na mucosa ileocecal, granulomatosa com eosinofilia, e posteriormente estenose intestinal, desenvolvendo sintomas de febre, anorexia, náuseas, vômito e dor abdominal. Os ovos eclodem na parede intestinal com liberação das larvas L1 e eliminação juntamente com as fezes (Neafie e Marty, 1993; Romero-Alegría et al., 2014) (Figura 6). No Brasil há registros de casos principalmente em São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (Valente et al., 2018; Bender et al., 2003).

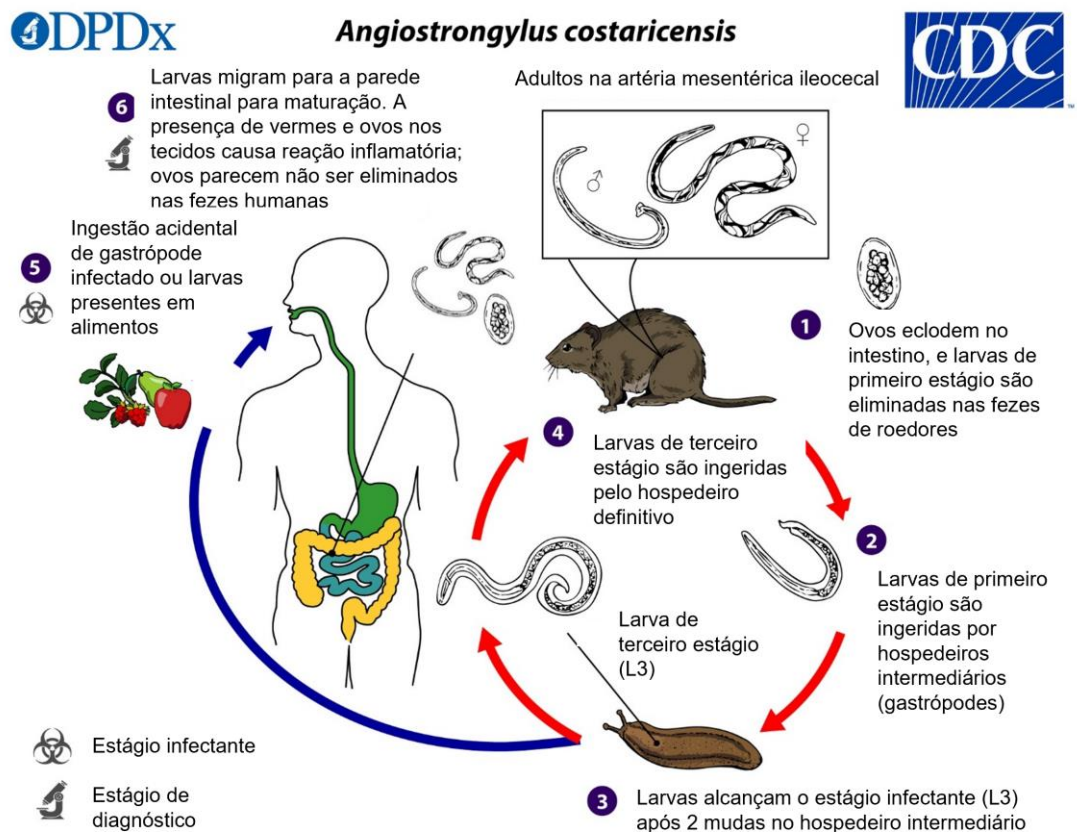


Figura 6: Ciclo biológico de *Angiostrongylus costaricensis*

Fonte: https://www.cdc.gov/dpdx/angiostrongyliasis_cos/modules/Angio-cost_LifeCycle_19.jpg
(adaptado para a língua portuguesa pela autora)

2.6. Aspectos morfológicos e morfométricos de larvas de nematódeos

Chaves de identificação e estudos morfológicos e morfométricos de nematódeos referem-se principalmente as formas adultas desses organismos, tanto fitonematódeos quanto parasitas humanos ou animais, envolvendo muitas vezes imagens microscópicas de ultraestrutura para auxiliar na identificação (Burrows, 1962; Yoshida, 1971; Anderson, 2009; Ferraz, 2016). No entanto, para as formas larvares há poucos estudos morfológicos que auxiliem a identificação e diagnóstico diferencial em amostras ambientais, onde há grande diversidade de espécies coexistindo.

Descrições morfológicas detalhadas de diversas espécies de *Strongyloides* foram realizadas por Little (1966), em estudo morfológico comparativo, a fim de obter critérios específicos de identificação baseados principalmente em características das formas adultas e em algumas características das larvas infectantes, formando a base de descrição do gênero. Vieira (2006) estudou a morfologia e biometria de ovos e larvas de *Strongyloides* sp. isoladas de amostras fecais de capivara para caracterização morfométrica de ovos, L1, L2 e L3 de *Strongyloides* sp., e concluiu que os dados são semelhantes aos das demais espécies do gênero, confirmando as descrições de Little (1966). Teixeira (1997) e Miné (2009) realizaram análises morfométricas em larvas rabditóides e filarióides de *S. stercoralis* provenientes de infecções naturais humanas, na tentativa de detectar diferentes cepas de *S. stercoralis*. Tobar et al (2021) avaliaram as características morfológicas, morfométricas e moleculares de *S. venezuelensis* para implementação e padronização de um modelo experimental.

Kobayashi (1928) avaliou e descreveu as diferenças morfológicas entre três espécies principais de ancilostomídeos: *A. duodenale*, *A. caninum*, *A. braziliense* e *N. americanus*. Posteriormente, Nichols (1956) fez a descrição comparativa das principais características morfológicas e morfométricas de larvas com potencial de invadir tecidos humanos, entre elas *Ascaris lumbricoides*, *N. americanus*, *S. stercoralis* e *A. caninum*. Os aspectos morfológicos e morfométricos de larvas infectantes de *A.*

braziliense e *A. ceylanicum* foram estudadas por Yoshida (1971) e de *A. duodenale* e *N. americanus* por Correia et al (1979) e mais recentemente por Zhong-xing e Yi-xin (2018).

Ash (1970) verificou a possibilidade de distinção entre larvas de terceiro estágio de 4 espécies de vermes pulmonares encontrados em moluscos, *A. cantonensis*, *A. vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus* e *Anafilaroides rostratus*, por uma combinação de características morfológicas e morfométricas. Baseados nesses mesmos parâmetros, Rocco (2007) e Mota (2018) aplicaram o estudo morfométrico e confirmaram a possibilidade de diagnóstico diferencial de larvas de metastrongilídeos isoladas de moluscos morfológicamente compatíveis com *Angiostrongylus* spp.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Verificar o potencial de contaminação por nematódeos de risco a saúde em alface *in natura* e higienizadas comercializadas na cidade de São Paulo.

3.2. Objetivos específicos

Criar padrão morfométrico dos estágios larvários de nematódeos de importância médica, com provável ocorrência em alfaces: *Strongyloides*, ancilostomídeos e *Angiostrongylus* a fim de orientar o diagnóstico e avaliar o eventual risco à saúde;

Verificar a recuperação de larvas de nematódeos pelo método de detecção de ovos e larvas de helmintos padronizada por Matosinhos et al (2016) com modificações;

Avaliar a ocorrência de nematódeos em amostras de alfaces *in natura* e higienizadas e realizar o diagnóstico diferencial entre as larvas detectadas nas amostras e as larvas padrões, por meio de avaliação de similaridade entre as características morfométricas;

Verificar a conformidade das alfaces higienizadas com a Resolução ANVISA RDC nº14/2014 quanto à presença de matérias estranhas, e em especial de nematódeos de risco à saúde.

4. Material e Métodos

O estudo se dividiu em duas etapas, a primeira consistiu na obtenção de larvas de nematódeos padrões de gêneros de interesse médico como *Strongyloides venezuelensis*, *Strongyloides stercoralis*, ancilostomídeos, *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus costaricensis*, em diferentes estágios evolutivos, para caracterização morfológica e formação de um banco de dados morfométricos dos principais parâmetros corporais, além da confecção de pranchas com registros fotográficos. Na segunda etapa foi realizada a verificação e adaptação da metodologia de detecção de ovos e larvas de helmintos em amostras de alface e o monitoramento de 60 amostras de alface crespa de cultivo tradicional, sendo 30 amostras *in natura* e 30 amostras de alface higienizada, para isolamento dos nematódeos seguido de registro fotográfico e estudo morfométrico dos mesmos para fins de identificação e diagnóstico diferencial com as larvas dos nematódeos padrões.

4.1. Obtenção de larvas de nematódeos padrões de interesse médico e estudo morfométrico

4.1.1. Obtenção de larvas de *Strongyloides stercoralis*

As larvas de *S. stercoralis* utilizadas como padrão de referência para este estudo são da coleção de espécimes do Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz, originária da demanda de diagnósticos. Para o isolamento de larvas rabditoides (L1) de *S. stercoralis* é empregada a técnica de Rugai et al, 1954 diretamente às fezes frescas e recentemente emitidas de paciente infectado. Para obtenção de larvas infectantes (L3) é realizada cultura a partir de uma parte de fezes frescas para duas partes de carvão mineral granulado, acondicionada em placa de Petri, hidratada com água decolorada e incubada a temperatura ambiente por três dias. As L3 são

extraídas da mistura de fezes e carvão granulado pela técnica de Rugai et al. (1954).

4.1.2. Obtenção de larvas de *Strongyloides venezuelensis*

Strongyloides venezuelensis foi obtido de ciclo experimental realizado no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo por meio de repiques sucessivos entre culturas em carvão granulado e ratos norvegicus da linhagem Wistar. As larvas L3 (filarióides infectantes) foram recuperadas das culturas por termo e hidrotropismo em água.

Cultura em carvão

Ratos Wistar infectados a partir do 7º dia com *Strongyloides venezuelensis* são colocados em gaiolas gradeadas (tipo metabólica) por uma noite para coleta das fezes. As fezes são homogeneizadas e misturadas na proporção de uma parte para duas de carvão mineral, a mistura é acondicionada em placa de Petri e mantida em estufa a 28 °C. Para a obtenção de larvas L3 (filarióides infectantes), o material é incubado por dois dias. Para extração das formas larvárias é utilizada a técnica Baermann modificado, descrita por Lok (2007).

Infecção em roedores

Cerca de 10.000 larvas filarióides extraídas a partir da cultura de carvão, como descrito no item anterior, são inoculadas por via subcutânea na região abdominal de cada animal. Após sete dias de infecção as fezes são examinadas para verificar a presença de ovos. A eliminação de ovo nas fezes ocorre até o 28º dia após infecção, período em que se inicia a eliminação espontânea de vermes adultos do roedor.

Obtenção de larvas L1 e L2 de *S. venezuelensis*

Para obtenção de larvas L1 e L2 foi utilizada a técnica de Roldan et al. (2020), onde ovos extraídos das fezes de roedores infectados foram isolados, purificados e mantidos em cultura de ágar não nutritivo 2%. Larvas

rabditoides L1 foram obtidas em torno de 10 a 12 horas aproximadamente, e após algumas horas nesse meio foram obtidas larvas rabditoides L2.

4.1.3. Obtenção de estágios larvários de ancilostomídeos

Em virtude da dificuldade de obtenção de cepa padrão de ancilostomídeos para o estudo, amostras fecais de cães positivas para ancilostomídeos obtidas do Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo foram selecionadas por flutuação espontânea pelo Método de Willis-Mollay, 1921(Pessoa, 1981) em solução saturada de cloreto de sódio para a verificação da presença de ovos de ancilostomídeos. Para o cultivo dos ovos foi empregada a técnica de Harada e Mori (1955), conforme descrito por Corrêa et al.,1979. De cada amostra foram preparadas de três a cinco culturas, examinadas no terceiro, sexto e nono dia após incubação, com a finalidade de identificar e isolar os diferentes estágios evolutivos de L1 (rabditoide) a L3 (filarióides) e seus respectivos estádios em muda. Dessas amostras originou-se um pool de larvas rabditoide e filarióides que foram amostradas para o estudo morfométrico.

4.1.4. Obtenção de estágios evolutivos de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*

Manutenção do ciclo experimental de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* em laboratório

Angiostrongylus cantonensis e *Angiostrongylus costaricensis*, espécies de metastrongilídeos, são mantidas em ciclo experimental no Núcleo de Enteroparasitas por meio de repiques sucessivos entre roedores e moluscos do Gênero *Biomphalaria*. As larvas L3 são recuperadas a partir dos moluscos infectados experimentalmente e, as larvas L1, de fezes de roedores infectados. *A. cantonensis* foi isolado a partir de infecção natural de um espécime de *Rattus norvegicus* capturado em área urbana do município

de São Paulo, e é mantido desde 2010 em *B. glabrata* e em ratos da linhagem Wistar, conforme descrito por Mota et al., 2018. *A. costaricensis*, linhagem de Criciúma/RS, foi cedida pelo Instituto de Biociências da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e é mantido desde 2005 em *B. glabrata* e em hamster (*Mesocricetus auratus*). Para manutenção de rotina em laboratório são utilizados três roedores e 15 moluscos para cada espécie de *Angiostrongylus*, conforme protocolo descrito a seguir:

Infecção em *B. glabrata*

Ratos Wistar infectados por *A. cantonensis* a partir do 45º dia após infecção são colocados em gaiolas gradeadas (tipo metabólica) por uma noite para coleta das fezes a partir do 45º dia após infecção. O mesmo procedimento é realizado com hamsters no 35º dia de infecção por *A. costaricensis*. As fezes dos animais experimentais são homogeneizadas e submetidas ao processo de extração de larvas L1 pela técnica de Rugai et al. (1954) e, concentradas por centrifugação a 2000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante é descartado e o sedimento ajustado para 2 ml de água decolorada. Uma alíquota de 10 µL é usada para a contagem das larvas entre lâmina e lamínula em microscópio óptico. Cerca de 300 a 500 larvas L1 são utilizadas para infecção de cada caramujo. Os espécimes de *B. glabrata* são colocados individualmente em recipientes de vidro com tampa, medindo 30 mm de diâmetro por 39 mm de altura, contendo 3 ml de água decolorada e um fragmento de alface de 2 cm². As larvas L1 são depositadas sobre a alface e os caramujos são mantidos, em temperatura ambiente, nestes recipientes por 12 horas. A infecção dos caramujos ocorre, sobretudo, pela ingestão das larvas L1. Em seguida os moluscos são transferidos para aquários de 5 L, alimentados com alface e ração por 30 dias, tempo exigido para o desenvolvimento larvário para o estágio L3 (larva infectante).

Infecção em roedores

Caramujos (*B. glabrata*) com 30 dias de infecção são retirados das conchas por esmagamento e cortados em pequenos fragmentos. Os tecidos

são colocados em solução aquosa contendo pepsina a 4 mg% (Sigma P-7125) e ácido clorídrico (Merck PA) 0,7% por duas horas em banho-maria a 37 °C. Em seguida o material digerido é submetido à técnica de Rugai et al. (1954) para obtenção de larvas vivas. Cerca de 10 larvas L3 de *A. costaricensis* são administradas por via oral para cada hamster por meio de sonda esofágica. Da mesma maneira, 15 larvas L3 de *A. cantonensis* são usadas para infecção via oral para cada rato Wistar.

4.1.5. Estudo morfológico e morfométrico de larvas de nematódeos de interesse médico e avaliação da similaridade entre espécies do mesmo gênero

Com a finalidade de obtenção de parâmetros morfométricos das principais espécies de nematódeos de interesse médico associados à possibilidade de transmissão por vegetais, foi realizado o estudo morfológico e morfométrico de larvas padrões de *S. venezuelensis*, *S. stercoralis*, ancilostomídeos, *A. cantonensis* e *A. costaricensis*.

Todas as larvas de nematódeos padrões foram fixadas a quente (56°C) em AFA (solução de álcool, formol e ácido acético) ou álcool 70% e, conservadas na mesma solução até a montagem de lâminas para a realização do estudo morfométrico.

As lâminas contendo os nematódeos foram montadas em solução alcóolica a 70%, cobertas com lamínula e vedadas utilizando esmalte de unhas a fim de evitar a evaporação do conteúdo por cerca de 48 horas, tempo suficiente para conservação do material até a finalização do estudo.

O estudo morfológico, as mensurações e o registro fotográfico dos espécimes foram realizados em microscópio óptico de campo claro modelo Zeiss, em aumento de 100 a 400 X, utilizando o Programa Axio Vision LE. Morfologicamente foram considerados aspectos relacionados à extremidade cefálica (vestíbulo bucal), tipo de esôfago, presença ou ausência de poro excretor e de primórdio genital, extremidade caudal e cutícula. Quanto aos parâmetros morfométricos foram considerados: comprimento total do corpo (CTC); comprimento do esôfago (CE); largura do corpo, medida na altura da

junção esôfago intestino (LC); distância do poro excretor a extremidade anterior (DPE); distância do ânus a cauda (DAC); distância do primórdio genital a cauda (DPGC), com algumas variações de parâmetros conforme as espécies analisadas. Na Figura 7 estão exemplificadas as referidas medidas por meio das larvas de terceiro estágio de *Angiostrongylus cantonensis*.

Para o gênero *Strongyloides* e para os ancilostomídeos os parâmetros foram ampliados com a finalidade de aumentar o refinamento do diagnóstico diferencial. Foram adicionados os parâmetros: comprimento do vestíbulo bucal (CVB); largura da extremidade anterior (LEA), medida na altura da transição entre o vestíbulo bucal e o esôfago; comprimento do primórdio genital (CPG) e largura do primórdio genital (LPG), representados na Figura 8.

As medidas, obtidas em micrometros, foram tabuladas em programa Excel para cálculo de médias, medianas, desvio padrão, coeficiente de variação, relação entre largura do corpo e comprimento total do corpo (LC/CTC) e relação entre comprimento do esôfago e comprimento total do corpo (CE/CTC) de cada espécie estudada. As relações entre comprimento do vestíbulo bucal e largura da extremidade anterior (CVB/LEA) e comprimento e largura do primórdio genital (CPG/LPG) foram calculadas para o gênero *Strongyloides* e para os ancilostomídeos.

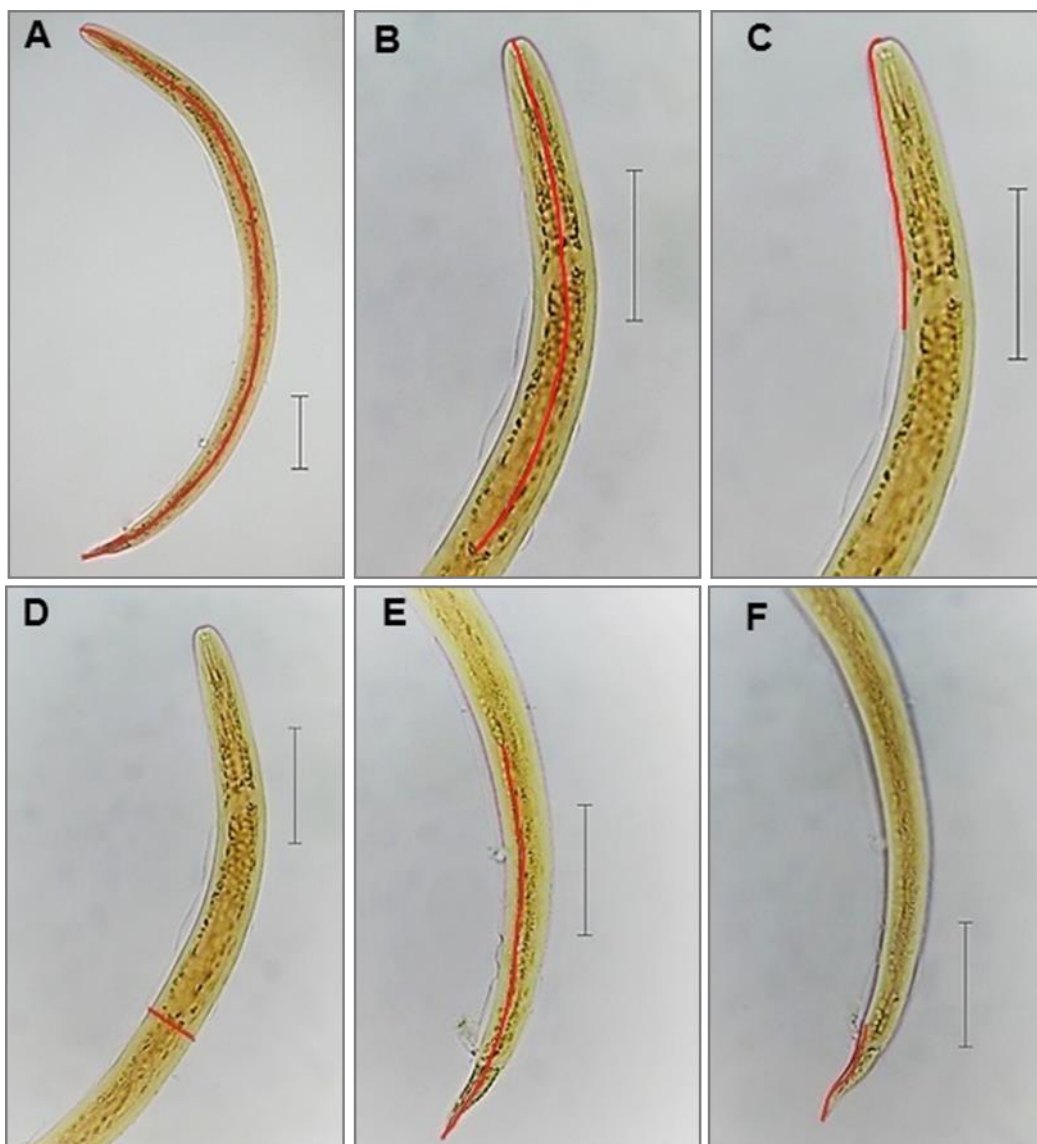


Figura 7: Medidas morfométricas demonstradas em larvas de terceiro estágio de *Angiostrongylus cantonensis*: **(A)** comprimento total do corpo (CTC); **(B)** comprimento do esôfago (CE); **(C)** distância do poro excretor a extremidade anterior (DPE); **(D)** largura do corpo (LC); **(E)** distância do primórdio genital a cauda (DPGC) **(F)** - distância do ânus a cauda (DAC) Escala=50 μ

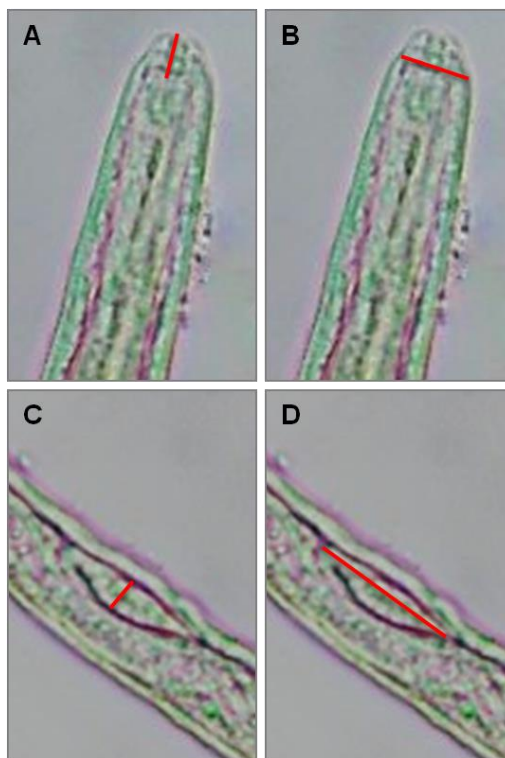


Figura 8: Medidas morfométricas adicionais, demonstradas em larvas rabditoide L1 de *Strongyloides stercoralis*: (A) comprimento do vestíbulo bucal (CVB); (B) largura da extremidade anterior (LEA); (C) comprimento do primórdio genital (CPG) e (E) largura do primórdio genital (LPG)

Complementarmente foi realizado um estudo de similaridade fenotípica entre os grupos de larvas padrões do mesmo gênero. No gênero *Strongyloides*, os dados morfométricos da espécie *S. stercoralis* foram comparados com os dados de *S. venezuelensis*, de forma separada para o estágio rabditoide e o estágio filarioide. No gênero *Angiostrongylus*, os dados da espécie *A. cantonensis* foram comparados com os dados de *A. costaricensis*, para cada estágio larvar (L1 e L3). Não foi realizado estudo de similaridade entre os ancilostomídeos por não serem originados de cepas padrões.

Para o estudo da similaridade, as medidas registradas para cada parâmetro morfométrico do grupo padrão de uma espécie foram comparadas com o intervalo de valores máximos e mínimos do grupo padrão da outra espécie, e transformadas em uma matriz binária, com atribuição de nota (escore) 0 ou 1. Adotou-se como escore 1 a medida que se encontrou dentro do intervalo de valores máximos e mínimos, e escore 0 a medida que estava

fora do intervalo de variação. A somatória das notas de escores obtida foi dividida pelo número de parâmetros avaliados (n) e convertidas em percentual de similaridade, conforme exemplo abaixo utilizando valores fictícios (Tabela 1 e 2).

Tabela 1: Exemplo de variação morfométrica do isolado de referência (µm)

Valores	CTC	CE	LC	DAC
Mínimo	250	70	14	35
Máximo	280	90	18	45

Tabela 2: Exemplo de estudo de similaridade entre espécies do mesmo gênero por aplicação de escore, considerando de uma a (n) larvas casos

Larva	CTC	Score	CE	Score	LC	Score	DAC	Score	Total
1	255	1	68	0	13	0	36	1	
2	278	1	79	1	15	1	44	1	
3	248	0	83	1	12	0	39	1	
...									
Total		2		2		1		3	8

Neste exemplo, foram avaliados 4 parâmetros e a somatória de escores obtida para três larvas caso foi 8. A similaridade é calculada pela relação entre o total de escores obtidos e o total de escores possíveis, considerando 100% de similaridade, ou seja, 8/12, determinando 66%. Para 100% de similaridade seria esperada uma somatória igual a 12, ou 0 para ausência de similaridade.

4.2. Detecção, isolamento e diagnóstico diferencial de nematódeos em amostras de alface

Para a detecção dos nematódeos nas amostras de alface foi aplicada a metodologia padronizada por Matosinhos et al. (2016), com uma modificação em relação a forma de observação do sedimento para favorecer a identificação microscópica dos espécimes. Em relação à técnica original, foi incluída uma etapa de observação do sedimento do líquido de lavagem

em microscópio estereoscópico, possibilitando a captura e transferência dos nematódeos para montagem de lâmina em solução mais limpa, de forma que as sujidades não comprometessem a avaliação dos detalhes morfológicos.

4.2.1. Verificação da metodologia modificada de detecção de nematódeos em amostra de alface

A verificação da recuperação dos nematódeos foi avaliada por meio de contaminação artificial de amostras de alface crespa higienizada com larvas filarióides fixadas de *Strongyloides venezuelensis*. Foram realizados três níveis diferentes de contaminação, em triplicata, conforme descrição a seguir.

As amostras de alface higienizadas foram descontaminadas por 15 min utilizando 10 mL de hipoclorito de sódio (teor de cloro ativo 2,0 - 2,5%p/p) em 1L de água filtrada, enxaguadas com água filtrada corrente e secas. Aproximadamente 30g de alface foram acondicionadas em saco plástico limpo, de primeiro uso, de aproximadamente 24 x 34 x 0,5 cm, onde foi realizada a contaminação artificial, em triplicata, para cada um dos níveis de contaminação. As larvas filarióides de *Strongyloides venezuelensis* utilizadas para contaminação foram previamente fixadas e isoladas em vidro relógio contendo água destilada, por contagem direta em microscópio estereoscópico, com quantidades pré-definidas de 10, 25 e 50 larvas. A contaminação foi realizada por meio de pipetagem de cerca de 200 µL do líquido contendo as larvas em diversos pontos da amostra, utilizando micropipeta automática de 20 µL. As amostras contaminadas foram mantidas em repouso por 2 horas em temperatura ambiente.

Após 2 horas da contaminação foi seguida a metodologia de Matosinhos et al. (2016), iniciando pela adição de 200 ml de solução de Glicina 1M, para lavagem das folhas, seguida de agitação manual por 3 minutos. Após a agitação, com auxílio de uma pinça grande, as folhas foram enxaguadas individualmente por meio de uma pisseta contendo água destilada, agitadas e descartadas. O líquido restante no saco plástico foi

peneirado em peneira plástica (malha de 1 mm) e recolhido em cálices para sedimentação por 2 horas. Em seguida, com auxílio de uma pipeta Pasteur, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e descartado, deixando 10 mL do sedimento em cada cálice, que foi transferido para um tubo de centrifugação de 15 mL. Os cálices foram lavados com 5 mL de água destilada, completando o volume do tubo em 15 mL para a centrifugação a 2.500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, deixando um sedimento de 1 mL em cada tubo, que foi transferido para um vidro relógio e totalmente examinado para a recuperação e quantificação dos nematódeos em microscópio estereoscópio.

4.2.2. Amostragem

Foram analisadas 30 amostras de alface *in natura* de cultivo convencional e 30 amostras de alface higienizada, adquiridas aleatoriamente no comércio varejista da cidade de São Paulo, como sacolões, mercados e feiras livres, no período de janeiro a agosto de 2020 (Figura 9 e 10).

As amostras foram mantidas sob refrigeração e processadas no Núcleo de Morfologia e Microscopia do Centro de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz Central.



Figura 9: Tipos de amostras de alface crespa adquiridas no comércio varejista da cidade de São Paulo (A) *in natura* e (B) higienizadas

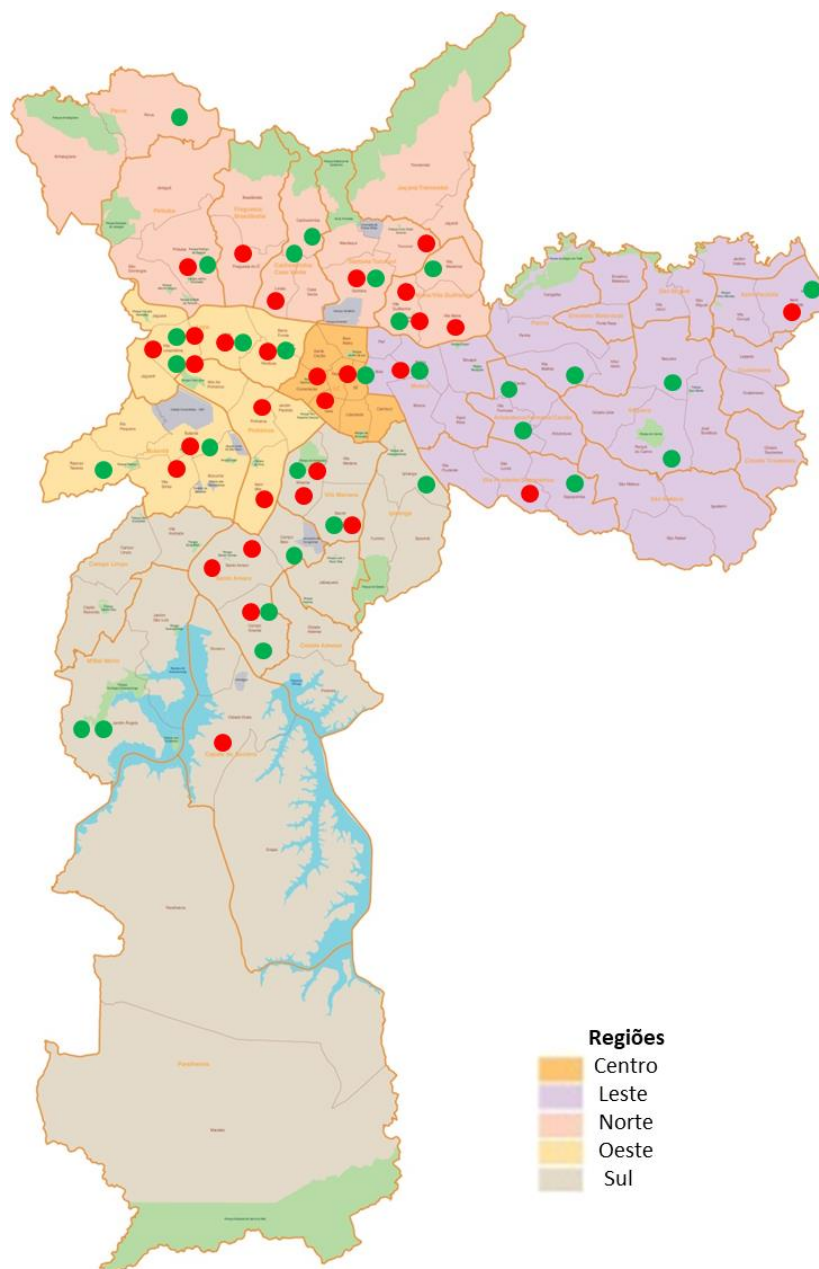


Figura 10: Distribuição das amostras de alface crespa *in natura* (verde) e higienizadas (vermelho) adquiridas no comércio do município de São Paulo, conforme regiões político-administrativas: norte, sul, centro, leste e oeste

4.2.3. Detecção e isolamento de nematódeos em amostras de alface crespa *in natura* e higienizada, comercializadas na cidade de São Paulo

A detecção dos nematódeos nas amostras de alface foi realizada de acordo com Matosinhos et al. (2016), utilizando os melhores parâmetros encontrados por estes autores para recuperação de larvas com relação ao

líquido extrator, agitação e tempo de sedimentação. Cada amostra foi analisada em triplicata para recuperação de maior quantidade de larvas.

As amostras de alface foram desfolhadas e distribuídas em um recipiente limpo e seco. As folhas estragadas foram descartadas e 30 g de folhas íntegras foram pesadas em saco plástico limpo, de primeiro uso, de aproximadamente 24 x 34 x 0,5 cm, prosseguindo a técnica conforme descrito no item 4.2.1 até a transferência do sedimento para o vidro relógio. A Figura 11 demonstra as etapas principais do processo.



Figura 11: Metodologia de detecção de nematódeos em amostras de alface: **(A)** desfolhamento e distribuição das folhas **(B)** lavagem manual em solução de glicina **(C)** retirada e lavagem das folhas **(D)** recolhimento do líquido de lavagem em cálice de sedimentação **(E)** sedimentação

Os nematódeos detectados no vidro relógio foram capturados, utilizando micropipeta automática de 20 uL e ponteira descartável, e transferidos para outro vidro relógio contendo água destilada, onde foram fixados com solução de lugol. Após a fixação, os espécimes foram

transferidos para lâminas, cobertas com lamínulas vedadas com esmalte e examinados individualmente ao microscópio óptico de campo claro, marca Zeiss, em aumento de 100 a 400 X e optovar variando de 1.0 a 2.5. Os nematódeos que não estavam em processo de deterioração foram fotografados com destaque para a região anterior, posterior e uma vista *in toto* do exemplar, utilizando o Programa Axio Vision LE. Adicionalmente foram obtidos os dados morfológicos e morfométricos dos mesmos parâmetros pré-estabelecidos para os padrões (CTC, CE, LC, DAC, DPGC, CVB, LEA, CPG e LPG).

4.2.4. Identificação e diagnóstico diferencial dos nematódeos isolados das amostras

Os exemplares que apresentaram caracteres morfológicos básicos adequados para identificação, como clara definição da região esofagiana, tipo, formato e apêndices da cavidade bucal e da região caudal, foram classificados de acordo com Andrassy, 1983; Ferraz, 2016; De Ley e Blaxter, 2004 e Ferris, 2020, com auxílio do Dr. Luiz Carlos Camargo Barbosa Ferraz, especialista em taxonomia de fitonematóides.

Foi realizada triagem, baseada nos aspectos morfológicos característicos dos padrões de larvas de risco à saúde como extremidade anterior (cefálica), tipo de esôfago, primórdio genital, extremidade posterior (caudal) e tipo de cutícula para o isolamento de larvas sugestivas de risco. Estas foram selecionadas para avaliação morfológica detalhada e não foi realizado o estudo de similaridade por não apresentarem características compatíveis aos padrões.

4.2.5. Conformidade com a legislação

As amostras de alface higienizadas foram avaliadas em relação à sua conformidade com a RDC ANVISA nº 14 de 2014 (Brasil, 2014), quanto à presença de matérias estranhas e quanto à presença de nematódeos de risco à saúde. As matérias estranhas encontradas foram registradas qualitativamente, com exceção dos nematódeos isolados, que foram

quantificados e avaliados quanto ao seu potencial de risco à saúde, de acordo com os resultados obtidos pelo diagnóstico diferencial.

4.3. Análise estatística

Os dados do estudo morfológico e morfométrico dos padrões foram tabulados em Programa Excel e foi realizada a análise descritiva de cada grupo larvas, para verificação de média, mediana, desvio padrão e intervalo de variação dos diferentes parâmetros avaliados.

Os resultados da detecção de nematódeos nas amostras de alface foram tabulados em programa Excel para análise descritiva dos dados, com obtenção de médias, medianas, desvio padrão e intervalo de variação. A avaliação da associação existente entre as variáveis presença/ausência de nematódeos e tipo de amostra (*in natura*/higienizadas) foi realizada por comparação de populações utilizando o teste qui-quadrado, com nível de significância de 95%.

5. Resultados

5.1. Caracterização morfológica e morfométrica de padrões de larvas de nematódeos de interesse médico

5.1.1. Caracterização morfológica e morfométrica de larvas de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis*

As larvas rabditoides de *S. stercoralis* (Figura 12) e *S. venezuelensis* examinadas (Figuras 13 e 14) apresentaram características morfológicas semelhantes, como corpo filiforme, extremidade anterior arredondada, vestíbulo bucal curto, esôfago do tipo rhabditiforme com corpo, istmo e bulbo distintos e evidentes, anel nervoso periesofágico envolvendo a região do istmo, cutícula lisa, cauda reta e afilada, terminação da cauda pontiaguda e primórdio genital ventral proeminente, alongado e de formato oval. Especificamente para *S. venezuelensis*, as larvas rabditoides de primeiro (L1) e segundo estágio (L2) são morfologicamente análogas, porém as L2 apresentaram um alongamento de todo o corpo. Os dados morfométricos correspondentes às larvas rabditoides de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* estão apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5.

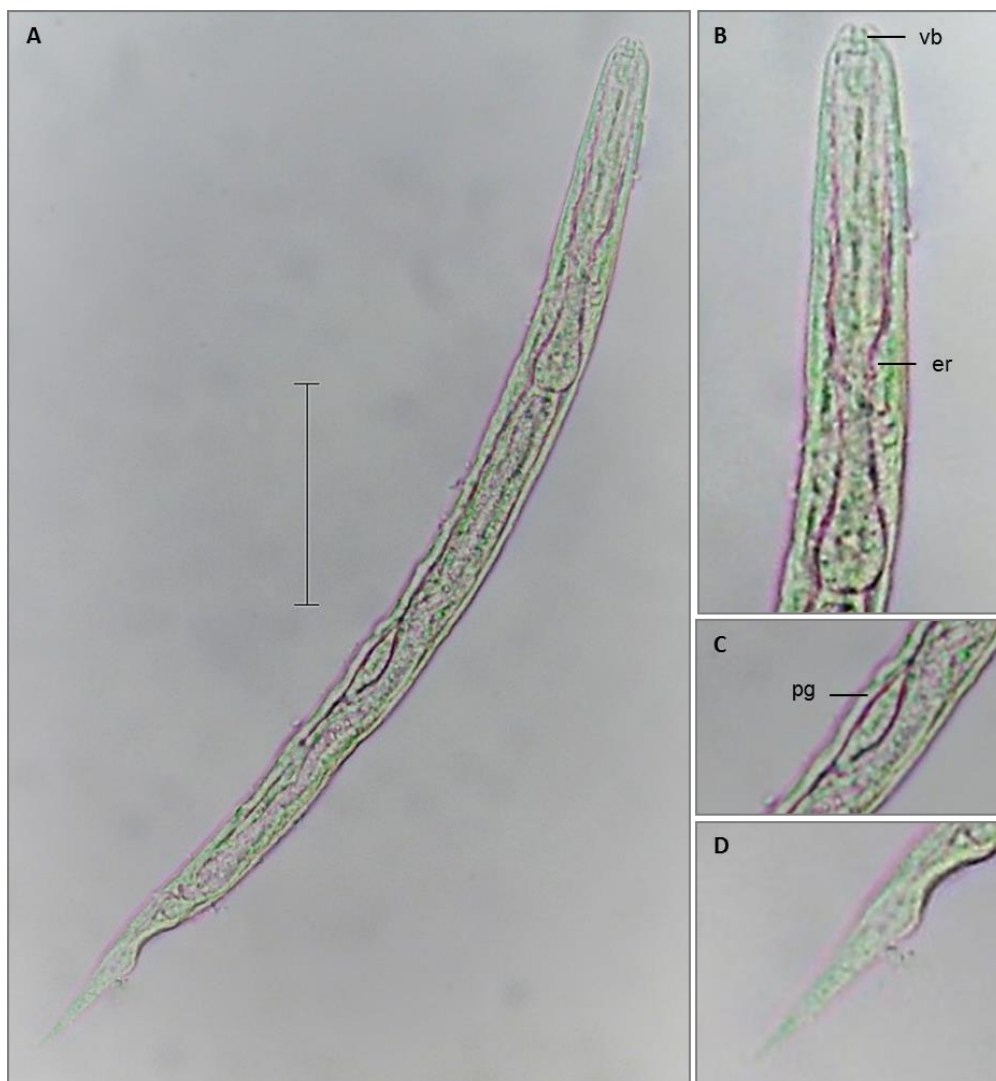


Figura 12: Fotomicrografia de larva rabditoide (L1) de *S. stercoralis*. **(A)** Vista total **(B)** Detalhe da extremidade anterior demonstrando o vestibulo bucal (vb) e o esôfago rabditoide (er) **(C)** Detalhe do primórdio genital (pg) e **(D)** Detalhe da extremidade posterior. Escala de A=50 μ

Tabela 3: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas rabditoides (L1) de *S. stercoralis* (n=20)

Parâmetros morfométricos	Média e desvio padrão	Mediana	Variação (mínima-máxima)
CTC	261,29 $\pm$ 15,42	260,68	236,77-299,92
CE	73,31 $\pm$ 4,14	79,18	70,91-86,07
LC	14,93 $\pm$ 0,73	14,92	13,61-17,01
DPGC	105,86 $\pm$ 8,82	106,42	88,96-123,17
DAC	43,88 $\pm$ 3,22	45,19	37,65-47,84
LC/CTC	0,05 $\pm$ 0,02	0,06	0,00-0,06
CE/CTC	0,29 $\pm$ 0,07	0,30	0,00-0,34
CVB	3,62 $\pm$ 0,76	3,47	2,73 - 4,98
LEA	8,47 $\pm$ 0,86	8,34	7,36 - 9,57
CVB/LEA	0,43 $\pm$ 0,08	0,42	0,33 - 0,59
CPG	16,89 $\pm$ 2,34	17,04	11,84 - 20,73
LPG	4,80 $\pm$ 0,57	4,87	3,55 - 6,07
CPG/LPG	3,54 $\pm$ 0,47	3,60	2,54 - 4,26

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; CVB: comprimento do vestibulo bucal; LEA: largura da extremidade anterior; CPG: comprimento do primórdio genital e LPG: largura do primórdio genital

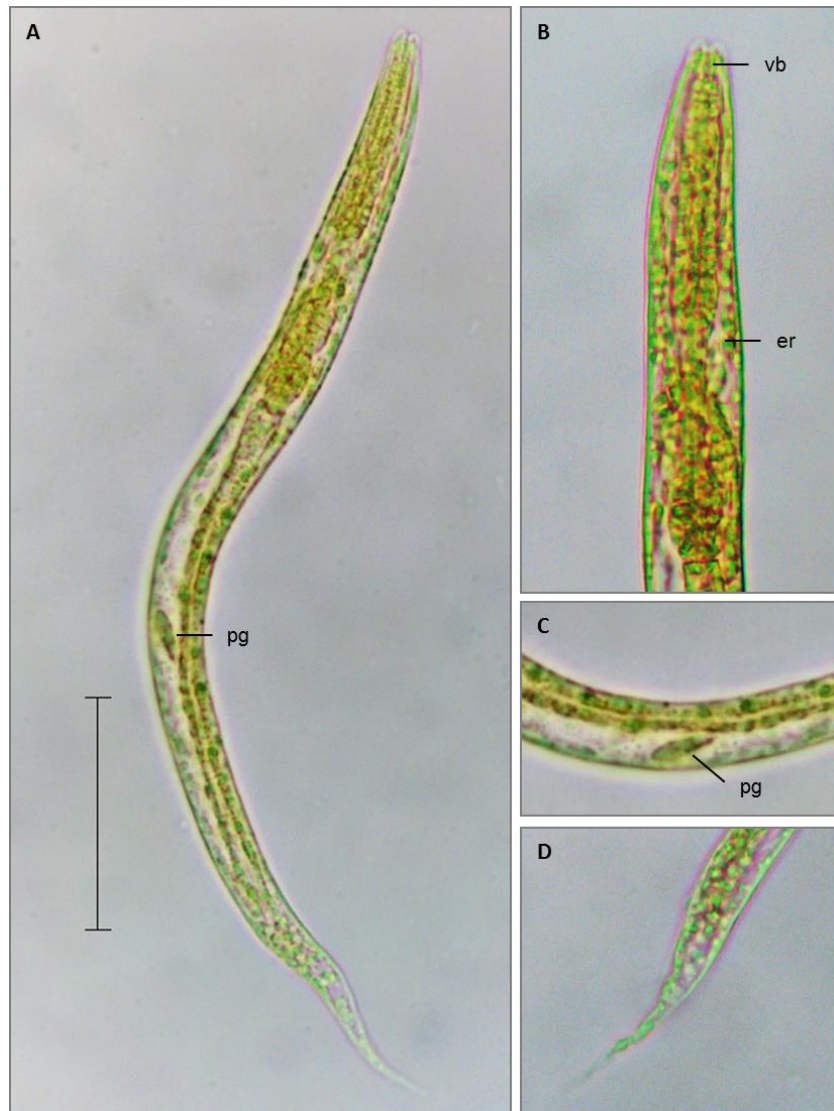


Figura 13: Fotomicrografia de larva rabditoide (L1) de *S. venezuelensis*. **(A)** Vista total **(B)** Detalhe da extremidade anterior demonstrando o vestíbulo bucal (vb) e o esôfago rabditoide (er) **(C)** Detalhe do primórdio genital (pg) e **(D)** Detalhe da extremidade posterior. Escala de A=50 μ

Tabela 4: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas rabditoides (L1) de *S. venezuelensis* (n=30)

Parâmetros	Média e desvio padrão	Mediana	Variação (mínima-máxima)
CTC	226,46 $\pm$ 16,43	223,60	201,22 - 265,67
CE	75,43 $\pm$ 4,16	75,37	68,08 - 86,14
LC	12,77 $\pm$ 1,30	12,39	10,99 - 15,88
DPGC	99,01 $\pm$ 10,47	95,10	87,46 - 117,98
DAC	33,52 $\pm$ 2,43	33,92	29,20 - 37,84
LC/CTC	0,06 $\pm$ 0,00	0,06	0,05 - 0,07
CE/CTC	0,33 $\pm$ 0,01	0,33	0,31 - 0,36
CVB	4,12 $\pm$ 0,81	3,925	2,95 - 6,07
LEA	6,59 $\pm$ 0,51	6,545	5,87 - 8,04
CVB/LEA	0,62 $\pm$ 0,09	0,62	0,47 - 0,84
CPG	10,62 $\pm$ 2,47	11,00	5,65 - 15,88
LPG	2,83 $\pm$ 0,42	2,96	2,12 - 3,49
CPG/LPG	3,75 $\pm$ 0,68	3,73	2,55 - 5,19

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; CVB: comprimento do vestibulo bucal; LEA: largura da extremidade anterior; CPG: comprimento do primórdio genital e LPG: largura do primórdio genital

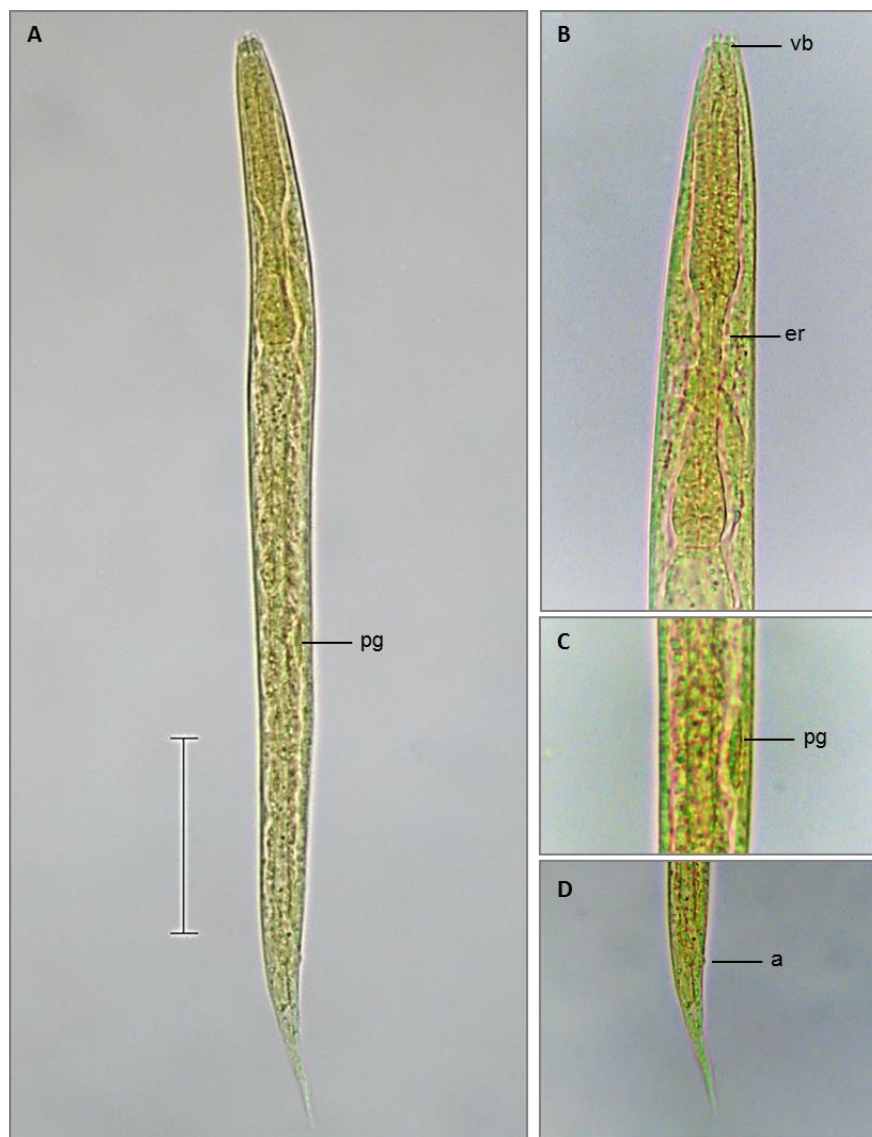


Figura 14: Fotomicrografia de larva rabditoide (L2) de *S. venezuelensis*. **(A)** Vista total **(B)** Detalhe da extremidade anterior demonstrando o vestíbulo bucal (vb) e o esôfago rabditoide (er) **(C)** Detalhe do primórdio genital (pg) e **(D)** Detalhe da extremidade posterior demonstrando o ânus (a). Escala de A=50 μ

Tabela 5: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas rabditoides (L2) de *S. venezuelensis* (n=32)

Parâmetros	Média e desvio padrão	Mediana	Variação (mínima-máxima)
CTC	504,36 $\pm$ 30,56	507,67	442,49 - 576,91
CE	100,33 $\pm$ 6,65	99,23	90,01 - 120,48
LC	19,02 $\pm$ 1,78	18,33	16,78 - 23,77
DAC	64,49 $\pm$ 5,47	65,53	55,10 - 77,35
DPGC	229,92 $\pm$ 19,99	232,50	172,04 - 264,54
LC/CTC	0,04	0,04	0,03-0,05
CE/CTC	0,2 $\pm$ 0,01	0,20	0,18-0,22
CVB	4,47 $\pm$ 0,78	4,42	3,41 - 6,30
LEA	7,23 $\pm$ 0,59	7,41	6,20 - 8,66
CPG	16,10 $\pm$ 3,14	16,97	11,85 - 24,29
LPG	3,68 $\pm$ 1,21	3,66	2,12 - 8,12
CVB/LEA	0,56 $\pm$ 0,18	0,58	0,00 - 0,83
CPG/LPG	4,17 $\pm$ 1,73	4,37	0,00 - 8,40

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; CVB: comprimento do vestíbulo bucal; LEA: largura da extremidade anterior; CPG: comprimento do primórdio genital e LPG: largura do primórdio genital

As larvas rabditoides (L1) de *S. stercoralis* apresentaram valores aproximados de média e mediana, com desvio padrão inferior a 10% para todos os parâmetros avaliados, indicando pouca variabilidade morfométrica entre os exemplares analisados para esse estudo (Tabela 3).

Foi observada pouca variação entre os valores médios nos parâmetros morfométricos das larvas rabditoides L1 e L2 de *S. venezuelensis*, com exceção da DPGC, cujo desvio padrão foi levemente superior a 10%, em ambos os grupos. Como esperado, as larvas rabditoides L2 apresentaram-se maiores em todas as dimensões, em relação às larvas rabditoides L1, porém as relações LC/CTC e CE/CTC foram inferiores, devido ao aumento expressivo do comprimento médio das larvas L2 (Tabelas 4 e 5).

As larvas filarioides de *S. stercoralis* (Figura 15) e *S. venezuelensis* (Figura 16) apresentaram corpo afilado, extremidade anterior arredondada com cavidade bucal menos evidente e ausência de vestíbulo bucal, esôfago do tipo filariforme, sem distinção entre corpo, istmo e bulbo, cutícula lisa,

primórdio genital pouco evidente, cauda reta e afilada e terminação da cauda com entalhe apical.

Os dados morfométricos correspondentes às larvas rabditoides de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

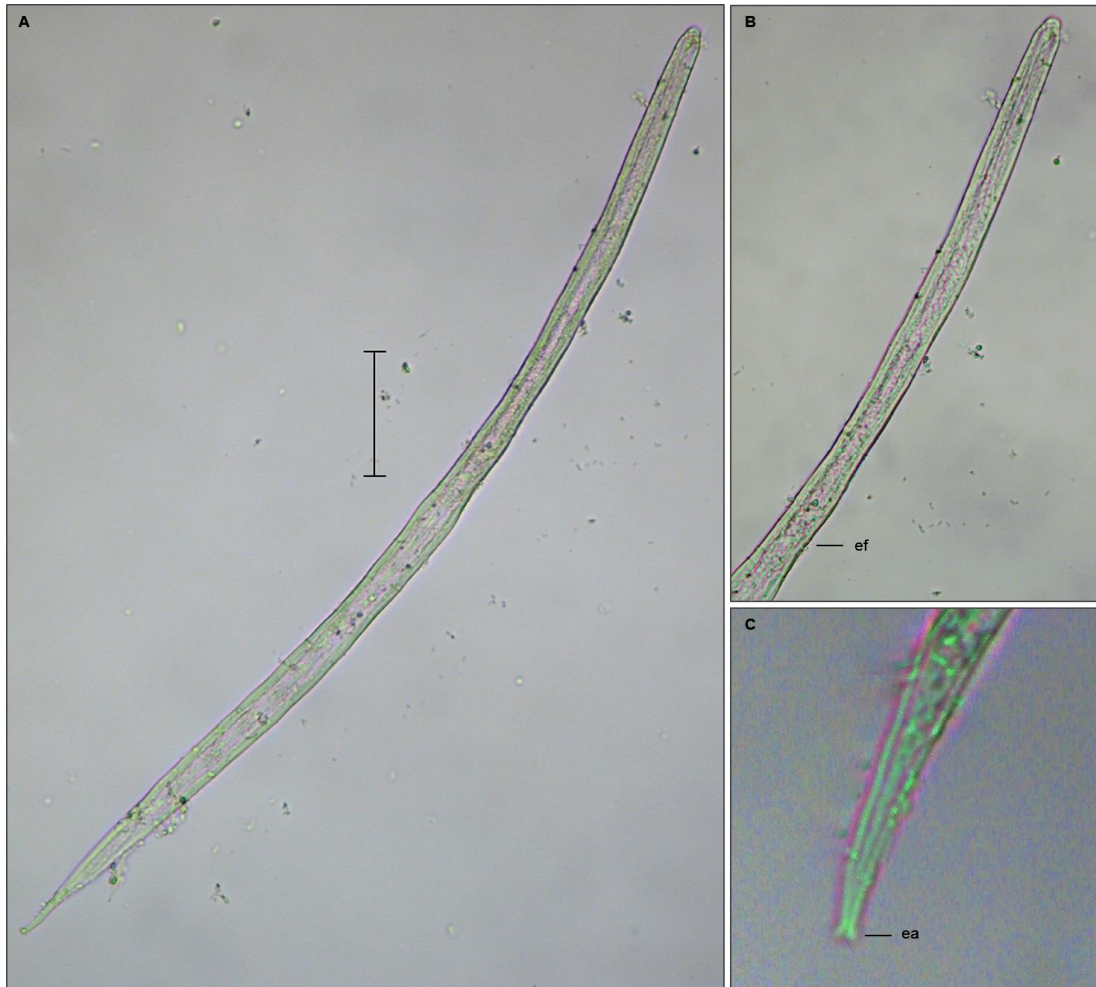


Figura 15: Fotomicrografia de larva filarioide de *S. stercoralis*. **(A)** Vista total **(B)** Detalhe da extremidade anterior demonstrando o esôfago filarioide (ef) **(C)** Detalhe da extremidade posterior demonstrando a ponta da cauda com entalhe apical (ea). Escala de A=50 μ

Tabela 6: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas filarioides (L3) de *S. stercoralis* (n=33)

Parâmetros	Média e desvio padrão	Mediana	Variação (mínima-máxima)
CTC	454,74 $\pm$ 13,74	456,44	425,68-483,73
CE	177,70 $\pm$ 17,63	176,83	123,83-211,09
LC	12,45 $\pm$ 0,74	12,38	11,01-14,24
DAC	57,35 $\pm$ 4,95	57,97	44,07-64,05
DPGC	162,64 $\pm$ 12,44	161,70	148,35-204,84
LC/CTC	0,02 $\pm$ 0,01	0,03	0,00-0,03
CE/CTC	0,28 $\pm$ 0,18	0,37	0,00-0,44
LEA	7,16 $\pm$ 0,69	7,05	6,02 - 9,12

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; LEA: largura da extremidade anterior



Figura 16: Fotomicrografia de larva filarioide de *S. venezuelensis*. **(A)** Vista total **(B)** Detalhe da extremidade anterior demonstrando o esôfago filarioide (ef) **(C)** Detalhe da extremidade posterior demonstrando a ponta da cauda com entalhe apical (ea). Escala de A=50 μ

Tabela 7: Estatística descritiva (μ m) de parâmetros morfométricos de larvas filarioides (L3) de *S. venezuelensis* (n=35)

Parâmetros	Média e desvio padrão	Mediana	Variação (mínima-máxima)
CTC	502,16 $\pm$ 29,33	506,21	433,21 - 547,78
CE	180,48 $\pm$ 10,86	180,87	160,87 - 196,69
LC	15,85 $\pm$ 1,51	15,87	12,95 - 19,26
DAC	57,12 $\pm$ 6,84	58,16	40,89 - 66,67
LC/CTC	0,032 $\pm$ 0,00	0,03	0,02 - 0,04
CE/CTC	0,36 $\pm$ 0,02	0,36	0,31 - 0,41
LEA	5,97 $\pm$ 0,42	5,93	5,25 - 7,08

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; LEA: largura da extremidade anterior

As larvas filarioides de *S. stercoralis* e de *S. venezuelensis* apresentaram valores médios aproximados nos parâmetros analisados, demonstrando pouca variabilidade entre os espécimes do mesmo grupo.

A comparação morfométrica entre *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* demonstrou similaridade de 59% para larvas rabditoides (L1) e de 79% para larvas filarioides (L3). Os parâmetros relacionados a extremidade anterior (CVB e LEA) e ao primórdio genital (CPG e LPG) foram os que apresentaram maior diferenciação entre os grupos.

5.1.2. Caracterização morfológica e morfométrica de larvas de ancilostomídeo

As larvas rabditoides de ancilostomídeos apresentaram corpo filiforme, extremidade anterior arredondada, esôfago rabditoide dividido em corpo, istmo e bulbo, vestibulo bucal longo, cauda afilada e terminação da cauda pontiaguda. Primórdio genital pouco visível (Figura 17). A Tabela 8 demonstra a estatística dos parâmetros morfométricos desse grupo.

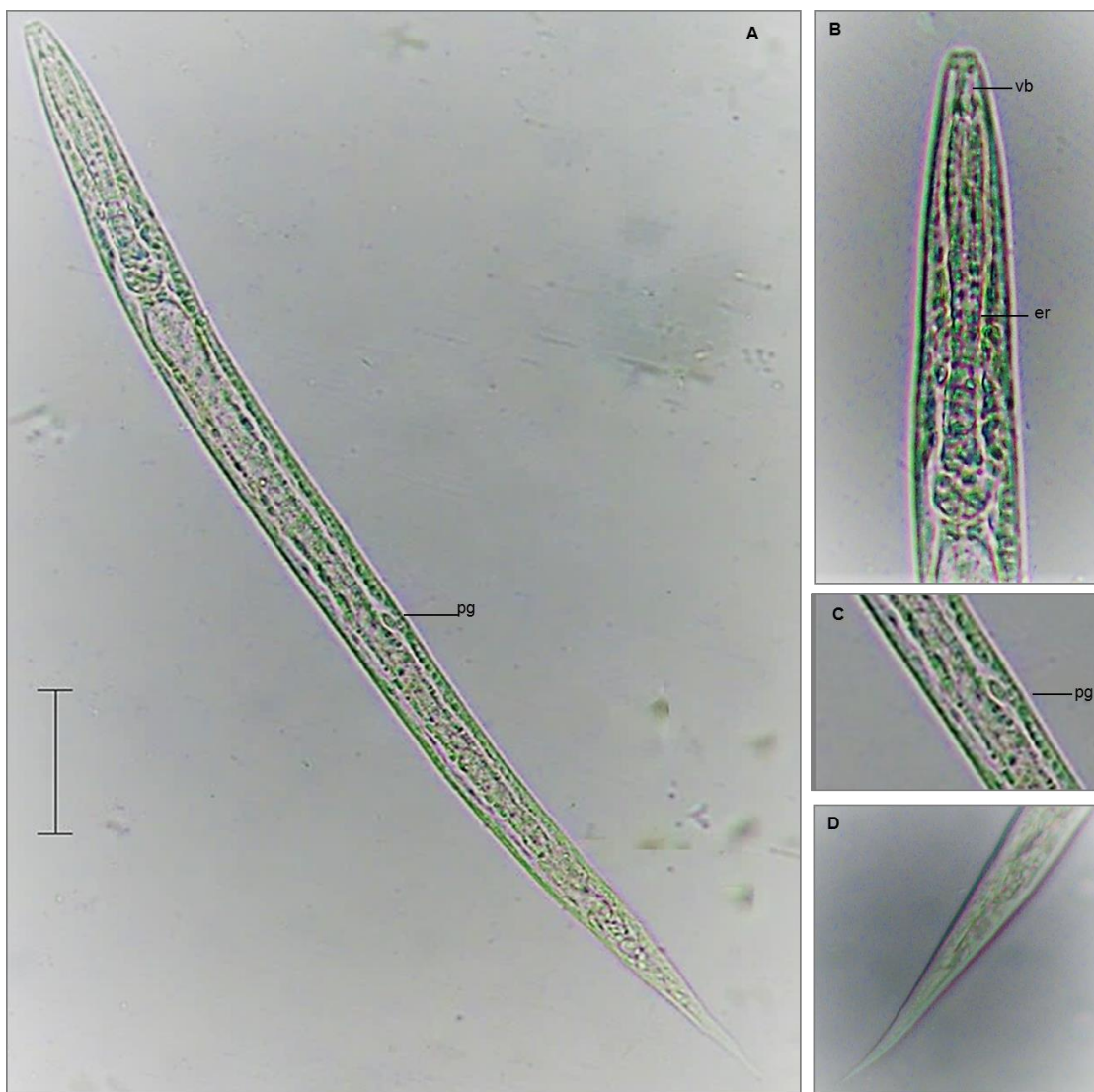


Figura 17: Fotomicrografia de larva rabditoide de ancilostomídeo **(A)** Vista total **(B)** Detalhe da extremidade anterior demonstrando o vestibulo bucal (vb) e o esôfago rabditoide (er) **(C)** Detalhe do primórdio genital (pg) e **(D)** Detalhe da extremidade posterior. Escala de A=50 μ

Tabela 8: Estatística descritiva (μm) de parâmetros morfométricos de larvas rabditóides de ancilostomídeos (n=40)

Parâmetros	Média e desvio padrão	Mediana	Variação (mínima-máxima)
CTC	603,23 $\pm$ 63,26	617,44	328,00 - 695,78
CE	123,9 $\pm$ 12,23	125,16	80,24 - 147,43
LC	24,29 $\pm$ 2,74	24,53	16,03 - 29,89
DAC	92,2 $\pm$ 10,38	94,33	65,95 - 105,47
DPGC	262,89 $\pm$ 11,78	257,74	253,05 - 283,02
LC/CTC	0,04 $\pm$ 0,01	0,04	0,00 - 0,05
CE/CTC	0,19 $\pm$ 0,06	0,21	0,00 - 0,27
CVB	15,59 $\pm$ 1,96	16,18	10,18 - 18,06
LEA	13,44 $\pm$ 1,67	13,85	9,02 - 15,87
CPG	10,12 $\pm$ 0,94	10,52	8,82 - 11,03
LPG	3,02 $\pm$ 0,43	2,75	2,68 - 3,62
CVB/LEA	1,16 $\pm$ 0,09	1,16	0,96 - 1,34
CPG/LPG	3,46 $\pm$ 0,72	3,92	2,44 - 4,01

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; CVB: comprimento do vestíbulo bucal; LEA: largura da extremidade anterior; CPG: comprimento do primórdio genital e LPG: largura do primórdio genital

As larvas filarióides dos ancilostomídeos apresentaram corpo filiforme, extremidade anterior arredondada, ausência de vestíbulo bucal, cutícula com finas estrias, esôfago do tipo filarióide com corpo alongado e pequeno bulbo, cauda longa afilada, algumas com bainha, e terminação da cauda pontiaguda (Figura 18) e os parâmetros morfométricos estão representados na Tabela 9.

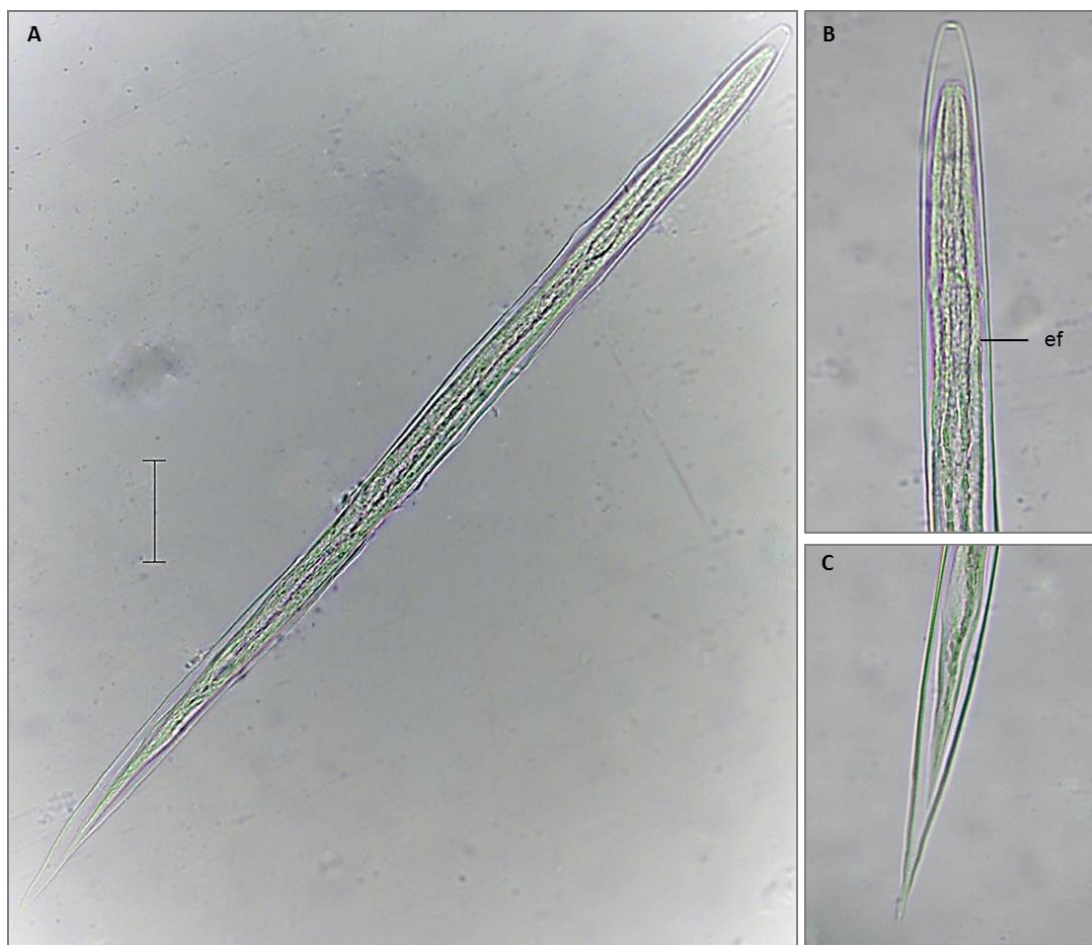


Figura 18: Fotomicrografia de larva filarioide (L3) de ancilostomídeo **(A)** Vista total **(B)** Detalhe da extremidade anterior demonstrando o esôfago filarioide (ef) **(C)** Detalhe da extremidade posterior. Escala de A=50 μ

Tabela 9: Estatística descritiva (μ m) de parâmetros morfométricos de larvas filarioides (L3) de ancilostomídeos (n=159)

Parâmetros	Média e desvio padrão	Mediana	Variação (mínima-máxima)
CTC	608,40 $\pm$ 42,66	621,91	480,76 - 685,59
CE	148,64 $\pm$ 12,55	152,28	103,69 - 167,85
LC	21,09 $\pm$ 2,71	21,02	11,02 - 28,64
DAC	76,24 $\pm$ 7,60	75,83	55,83 - 92,78
DPGC	239,40 $\pm$ 11,64	238,33	224,29 - 267,99
CTM	634,22 $\pm$ 35,03	634,10	534,43 - 706,83
LM	26,63 $\pm$ 3,51	25,92	14,78 - 34,19
LC/CTC	0,03 $\pm$ 0,00	0,03	0,02 - 0,04
CE/CTC	0,24 $\pm$ 0,03	0,24	0,18 - 0,27
LEA	12,24 $\pm$ 2,09	12,39	6,50 - 17,18

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; LEA: largura da extremidade anterior

Em virtude de ter sido analisado um pool de larvas rabditoides e filarioides de ancilostomídeos, de diferentes origens, verificou-se uma grande variação entre valores máximos e mínimos na maioria dos parâmetros avaliados, especialmente em relação ao CTC, indicando pouca uniformidade entre os espécimes. Porém, com exceção do CTC, os valores medianos de ambos se mantiveram aproximados e o desvio padrão se apresentou em torno de 10% para a maioria dos parâmetros. Para as larvas filarioides foram incluídos os valores de comprimento e largura da muda.

5.1.3. Caracterização morfológica e morfométrica de larvas de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*.

As larvas de primeiro estágio de *A. cantonensis* (Figura 19) e *A. costaricensis* (Figura 20) apresentaram corpo filiforme, cutícula com fracas estrias transversais, extremidade anterior arredondada, esôfago longo e claviforme (reto), ausência de vestibulo bucal, cauda curta e curva e terminação da cauda com uma ponta fina denominada espícula. Os respectivos dados morfométricos estão apresentados na Tabela 10 e 11.



Figura 19: Fotomicrografia de larva de primeiro estágio (L1) de *A. cantonensis*. **(A)** Vista total **(B)** Detalhe da extremidade anterior demonstrando o esôfago claviforme (ec) **(C)** Detalhe da extremidade posterior demonstrando o ânus (a) e espícula (es). Escala de A=50 μ

Tabela 10: Estatística descritiva (μ m) de parâmetros morfométricos de larvas de primeiro estágio (L1) de *A. cantonensis* (n=35)

Parâmetros	Média e desvio padrão	Mediana	Variação (mínima-máxima)
CTC	260,57 $\pm$ 20,01	263,33	206,73 - 291,35
CE	126,89 $\pm$ 8,10	128,10	101,33 - 136,12
LC	11,97 $\pm$ 0,75	11,90	10,67 - 13,81
DAC	19,59 $\pm$ 3,09	18,75	14,86 - 25,19
LC/CTC	0,05 $\pm$ 0,00	0,05	0,04 - 0,06
CE/CTC	0,49 $\pm$ 0,03	0,49	0,03 - 0,37

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DAC: distância do ânus a cauda



Figura 20: Fotomicrografia de larva de primeiro estágio (L1) de *A. costaricensis*. **(A)** Vista total **(B)** Detalhe da extremidade anterior demonstrando o esôfago claviforme (ec) **(C)** Detalhe da extremidade posterior demonstrando a espícula (es). Escala de A=50 μ

Tabela 11: Estatística descritiva (μ m) de parâmetros morfométricos de larvas de primeiro estágio (L1) de *A. costaricensis* (n=34)

Parâmetros	Média e desvio padrão	Mediana	Variação (mínima-máxima)
CTC	220,85 $\pm$ 9,22	221,50	201,99 - 243,96
CE	107,18 $\pm$ 3,66	107,38	97,8 - 114,40
LC	10,24 $\pm$ 0,62	10,15	9,38 - 12,91
DAC	21,13 $\pm$ 1,84	21,58	17,69 - 25,12
LC/CTC	0,05 $\pm$ 0,00	0,05	0,04 - 0,06
CE/CTC	0,49 $\pm$ 0,01	0,49	0,46 - 0,53

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DAC: distância do ânus a cauda

As larvas de primeiro estágio de *A. cantonensis* e de *A. costaricensis* apresentaram pouca variabilidade quanto aos parâmetros morfométricos avaliados, com pequeno desvio padrão e valores médios extremamente aproximados, ou até mesmo sem diferença em alguns parâmetros como LC/CTC e CE/CTC. L1 de *A. costaricensis* apresentaram valores de CTC, CE e LC menores do que as L1 de *A. cantonensis*, porém as relações LC/CTC e CE/CTC apresentaram valores numericamente iguais.

As larvas de terceiro estágio de *A. cantonensis* (Figura 21) e *A. costaricensis* (Figura 22) apresentavam corpo filiforme, extremidade anterior arredondada, esôfago longo e reto (claviforme), ausência de vestíbulo bucal, cauda curta e curva e terminação da cauda com espícula. Apresentaram também poro excretor e um pequeno primórdio genital ventral de formato oval. Os dados morfométricos destes grupos estão apresentados na Tabela 12 e 13.



Figura 21: Fotomicrografia de larva de terceiro estágio (L3) de *A. cantonensis*. **(A)** Vista total **(B)** Detalhe da extremidade anterior demonstrando o esôfago claviforme (ec) e poro excretor (pe) **(C)** Detalhe da extremidade posterior demonstrando o ânus (a) e a espícula (es). Escala de A=50 μ

Tabela 12: Estatística descritiva (μ m) de parâmetros morfométricos de larvas de terceiro estágio (L3) de *A. cantonensis* (n=44)

Parâmetros	Média e desvio padrão	Mediana	Variação (mínima-máxima)
CTC	455,10 $\pm$ 11,03	454,41	434,04 - 482,66
CE	173,85 $\pm$ 4,91	174,40	162,17 - 182,68
LC	25,72 $\pm$ 2,50	24,74	22,76 - 32,99
DPE	88,27 $\pm$ 3,00	88,12	81,11 - 97,78
DPGC	158,47 $\pm$ 7,34	158,93	136,02 - 174,52
DAC	35,64 $\pm$ 2,88	35,38	31,36 - 46,92
LC/CTC	0,05 $\pm$ 0,01	0,05	0,05 - 0,07
CE/CTC	0,38 $\pm$ 0,01	0,38	0,36 - 0,40

CTC:comprimento total do corpo; CE:comprimento do esôfago; LC:largura do corpo; DPE:distância do poro excretor; DPGC:distância do primórdio genital a cauda; DAC:distância do ânus a cauda



Figura 22: Fotomicrografia de larva de terceiro estágio (L3) de *A. costaricensis*. **(A)** Vista total **(B)** Detalhe da extremidade anterior demonstrando o esôfago claviforme (ec) e poro excretor (pe) **(C)** Detalhe da extremidade posterior demonstrando o ânus (a) e espícula (es). Escala de A=50 μ

Tabela 13: Estatística descritiva (μ m) de parâmetros morfométricos de larvas de terceiro estágio (L3) de *A. costaricensis* (n=32)

Parâmetros	Média e desvio padrão	Mediana	Varição (mínima-máxima)
CTC	459,65 $\pm$ 15,91	463,92	413,69 - 489,92
CE	153,08 $\pm$ 4,01	153,75	143,8 - 160,24
LC	25,12 $\pm$ 1,21	25,01	22,45 - 28,53
DPE	87,69 $\pm$ 4,00	88,48	75,7 - 95,31
DPGC	152,18 $\pm$ 8,40	152,66	132,66 - 166,39
DAC	31,63 $\pm$ 3,45	31,74	19,89 - 36,92
LC/CTC	0,05 $\pm$ 0,00	0,05	0,05 - 0,06
CE/CTC	0,33 $\pm$ 0,01	0,33	0,32 - 0,35

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPE: distância do poro excretor; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda

Larvas de terceiro estágio de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* apresentaram pouca ou nenhuma variabilidade nos parâmetros morfométricos analisados, principalmente DPGC, DAC, LC/CTC e CE/CTC, nos dois grupos individualmente. *A. costaricensis* ainda apresentou valores médios iguais para CE e LC, demonstrando tratar-se de um padrão bem homogêneo.

A comparação morfométrica entre *A. cantonensis* e *A. costaricensis* indicou 48% de similaridade entre as larvas L1, com menor similaridade para os parâmetros de CTC e CE e 76% de similaridade para as larvas L3, com menor similaridade para DAC e ausência de similaridade para CE.

5.2. Detecção, isolamento e diagnóstico diferencial de nematódeos em amostras de alface

5.2.1. Verificação da metodologia de detecção modificada

Os resultados da recuperação de larvas filarioides (L3) de *S. venezuelensis*, utilizadas para contaminação artificial das amostras de alface estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Recuperação (%) de larvas filarioides de *S. venezuelensis* em amostras de alface (*Lactuca sativa* L.) crespa higienizada

Nível de contaminação	Percentual de recuperação de larvas			
	A	B	C	Média
Nível 1 (10 larvas)	80	100	70	83
Nível 2 (25 larvas)	100	64	88	84
Nível 3 (50 larvas)	62	62	60	61

A verificação da metodologia de detecção de nematódeos modificada indicou uma média total de recuperação de 76% (± 16) além de variação na recuperação das larvas entre as replicatas e um decréscimo na

recuperação das larvas com o aumento do nível da contaminação. Em todos os níveis houve perdas de larvas na média das triplicatas, variando de 16 a 40%.

5.2.2. Detecção de nematódeos nas amostras de alface

Foram detectados nematódeos em 97% (29/30) das amostras de alface *in natura* e em 43% (13/30) das amostras higienizadas, apresentando diferença significativa em relação à frequência de nematódeos nos dois tipos de amostras ($p=0,05$). A análise descritiva dos dados está apresentada na Tabela 15.

Tabela 15: Média, desvio padrão, mediana e intervalo de variação do número de nematódeos em amostras de alface crespa *in natura* (n=30) e higienizadas (n=30)

Nematódeos detectados	<i>In natura</i>	Higienizadas
Média	28,2	0,9
Desvio padrão	55,9	1,8
Mediana	6,0	0,0
Máximo	278,0	9,0
Mínimo	0,0	0,0

As amostras *in natura* apresentaram maior número total de nematódeos isolados (845) em relação às amostras higienizadas (27), assim como maior variabilidade dos resultados entre as amostras e nas triplicatas intra-amostras (Anexo 12).

A Figura 23 representa a frequência e distribuição de nematódeos isolados nas amostras *in natura* e higienizadas, respectivamente.

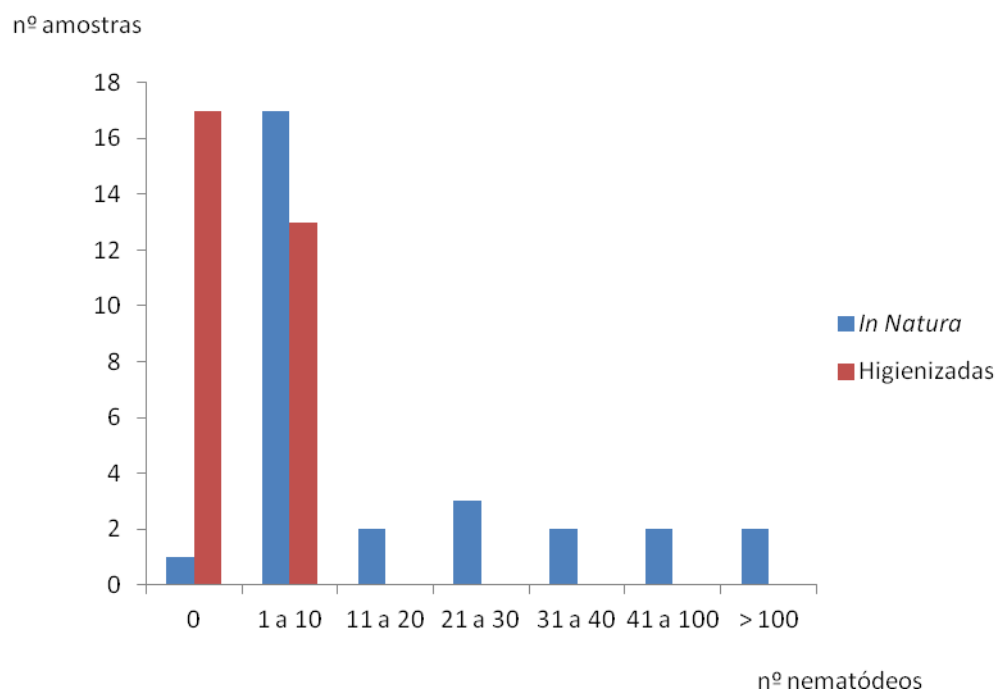


Figura 23: Frequência e distribuição de nematódeos isolados nas amostras de alface crespa *in natura* e higienizadas

A ausência de nematódeos foi mais frequente em alfaces higienizadas, ocorrendo em 57% das amostras, enquanto nas alfaces *in natura* esse fato ocorreu em apenas uma amostra. Em ambas o intervalo de variação mais frequente foi de 1 a 10 nematódeos e acima de 100 ocorreu exclusivamente em amostras *in natura*. Foram encontrados nematódeos vivos em 16 amostras *in natura* e em 4 amostras higienizadas.

5.2.3. Identificação dos nematódeos isolados

Apesar do alto número de nematódeos isolados no estudo, cerca de 65% deles se encontravam deteriorados ou em processo de deterioração, impossibilitando sua identificação. Uma amostragem de 91 exemplares foi identificada e está representada na Figura 24.

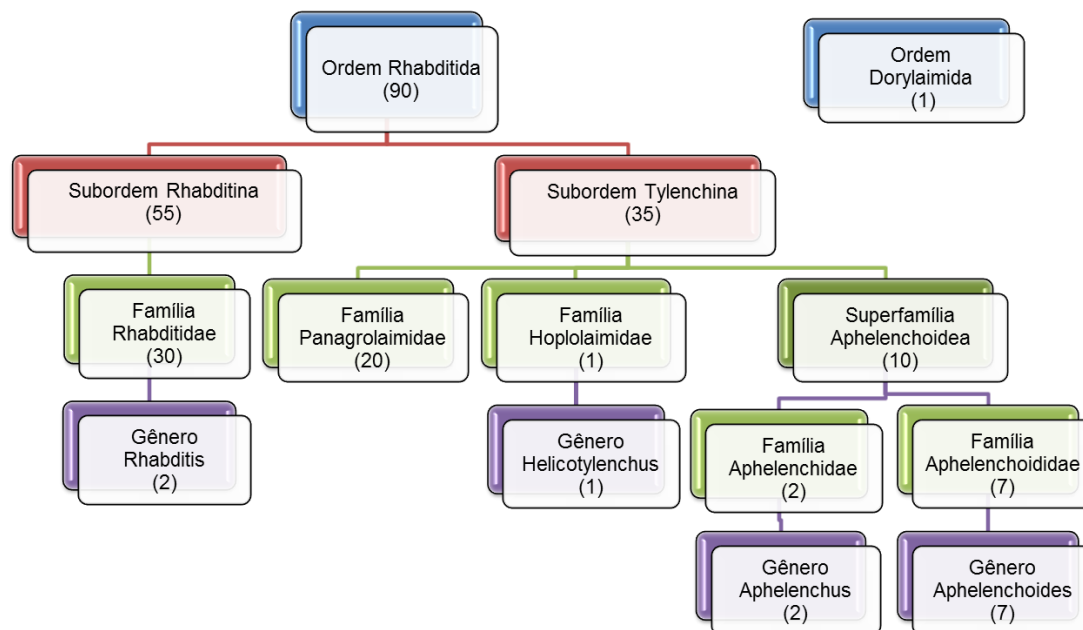


Figura 24: Fluxograma com apresentação dos espécimes identificados nas amostras de alface

Foi identificada a presença em grande maioria de nematódeos de vida livre da Ordem Rhabditida, Subordem Rhabditina (55) (Figura 25) e Subordem Tylenchina (35) (Figuras 26 e 27). O nível taxonômico das identificações variou em função da qualidade dos registros fotográficos em termos de detalhes das características básicas que tipificam a ordem, família, classe, entre outras.

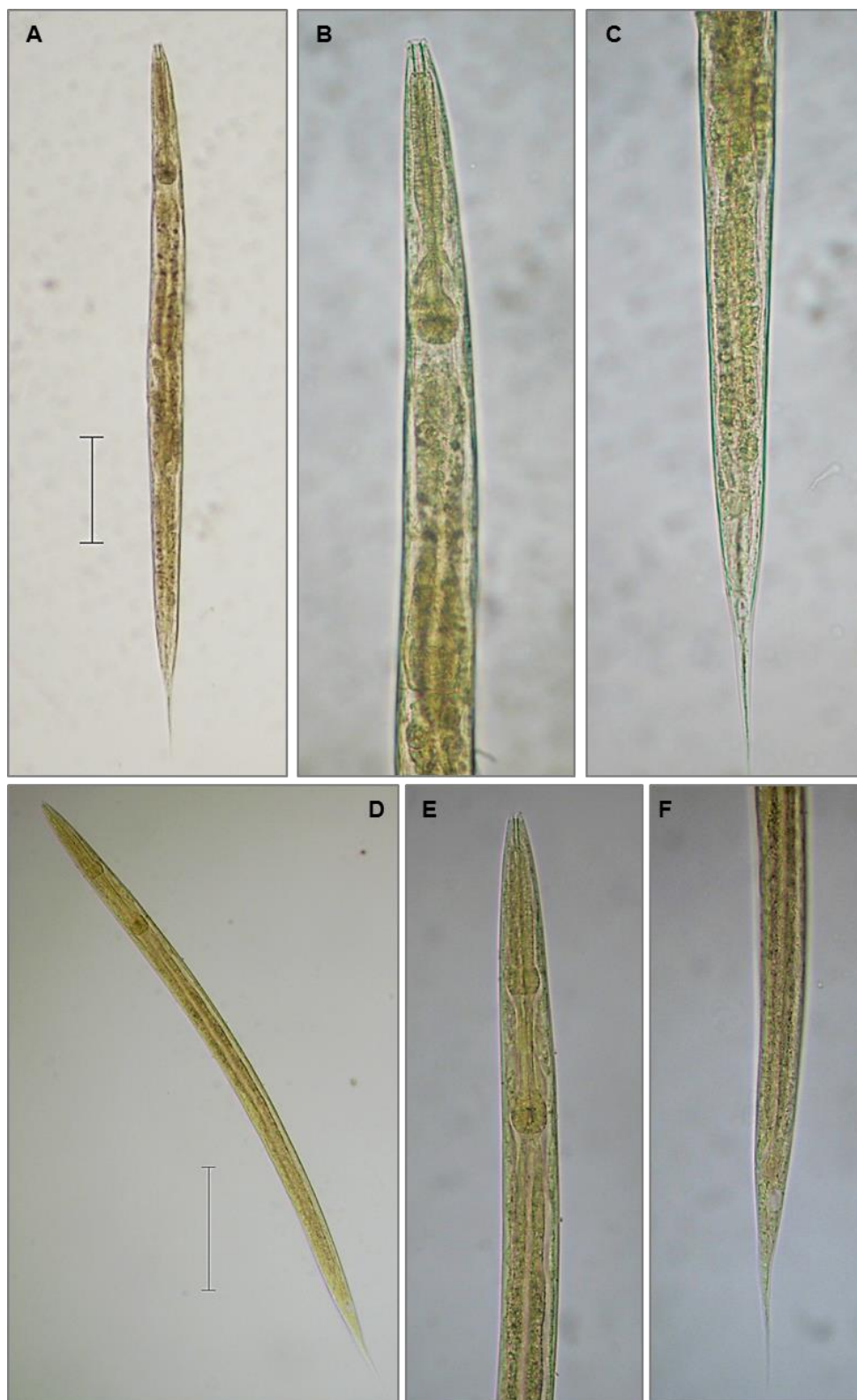


Figura 25: Exemplos da Ordem Rhabditida, Subordem Rhabditina, Família Rhabditidae. **(A),(D)** Vista total; **(B),(E)** Detalhe da extremidade anterior; **(C),(F)** Detalhe da extremidade posterior. Escala de A e D = 100 μ m



Figura 26: Exemplos da Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Família Panagrolaimidae. **(A),(D)** Vista total; **(B),(E)** Detalhe da extremidade anterior; **(C),(F)** Detalhe da extremidade posterior. Escala de A, D = 100 μ m



Figura 27: Exemplos da Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina. Família Aphelenchoidae. **(A),(D)** Vista total; **(B),(E)** Detalhe da extremidade anterior; **(C),(F)** Detalhe da extremidade posterior. Escala de A, D = 100µm

Com exceção de dois casos, um exemplar fitoparasita da Subordem Tylenchida/Gênero *Helicotylenchus* (Figura 28) e um exemplar onívoro da Ordem Dorylaimida (Figura 29), todos os demais espécimes identificados são formas bacteriófagas (Rhabditida) ou micófagas (Aphelenchida).

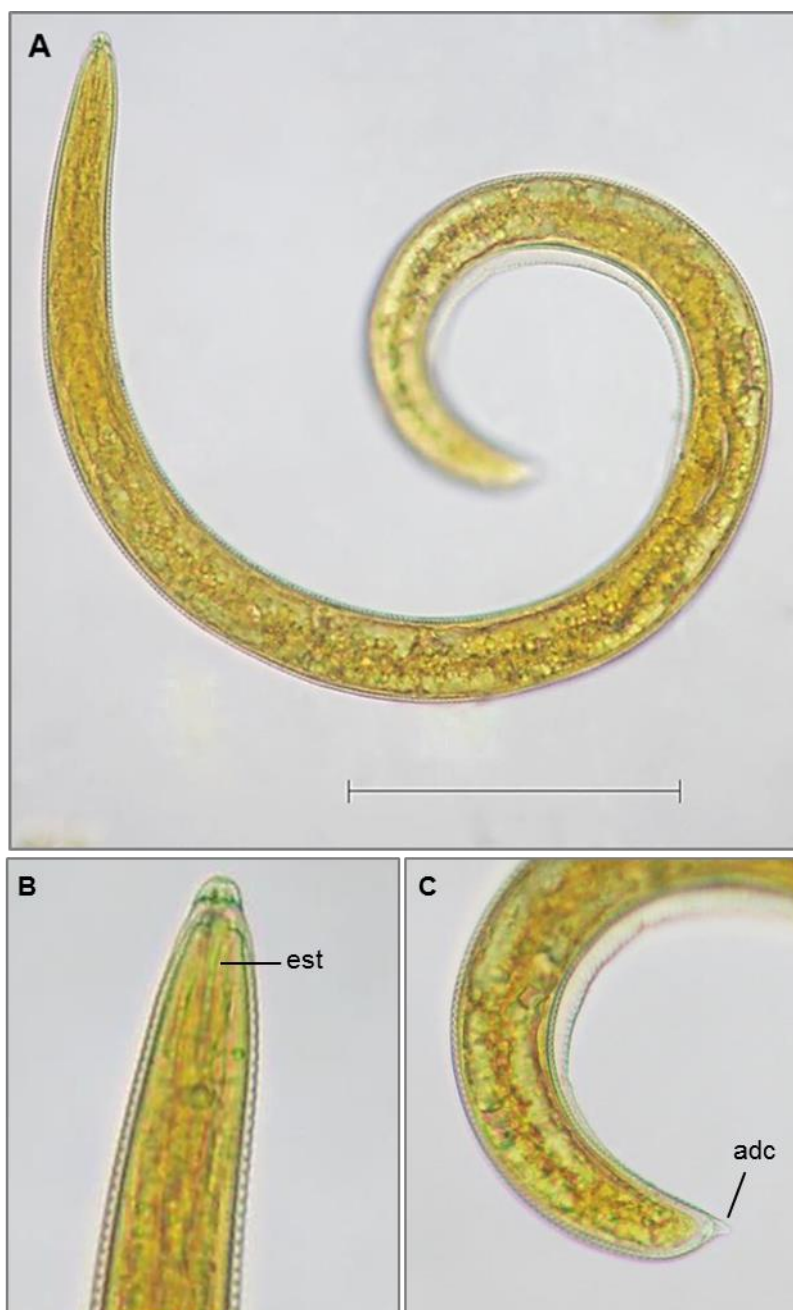


Figura 28: Exemplar de fitonematoide fêmea (juvenil 4) da Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchida, Família Hoplolaimidae, Gênero *Helicotylenchus* sp. **(A)** Vista total; **(B)** Detalhe da extremidade anterior demonstrando o estilete (est); **(C)** Detalhe da extremidade posterior, demonstrando o apêndice digital caudal (adc). Escala = 100µm



Figura 29: Exemplar da Ordem Dorylaimidae. **(A)** Vista total **(B)** Detalhe da extremidade anterior e **(C)** Detalhe da extremidade posterior. Escala de A = 100 μ m

Entre os isolados identificados foram encontrados nematódeos em estágios larvários (juvenis), machos (49) e fêmeas (68), entre elas, algumas fertilizadas com ovos e dois casos de fêmeas contendo larvas em seu interior, em eclosão matricida (Figura 30).



Figura 30: Exemplos de fêmeas de nematódeos **(A),(B)** fertilizadas com ovos e **(C),(D)** em eclosão matricida. Escala = 100µm

Dentre as larvas de nematódeos isoladas das amostras, 11 apresentaram características sugestivas de larvas rabditoides de *Strongyloides* spp., conforme apresentado nas Figuras 31 e 32, e 9 foram sugestivas de larvas rabditoides de ancilostomídeos, demonstradas nas

Figuras 33 e 34. Esses espécimens foram selecionados para diagnóstico diferencial com as respectivas larvas padrão. Não foram detectadas larvas sugestivas do gênero *Angiostrongylus* spp.



Figura 31: Exemplos de larvas rabditoides isoladas das amostras sugestivas de *Strongyloides* spp. Escala = 50µm



Figura 32: Exemplos de larvas rabditoides isoladas das amostras sugestivas de *Strongyloides* spp. Escala = 50µm



Figura 33: Exemplos de larvas rhabditoides isoladas das amostras sugestivas de ancilostomídeo. Escala = 50µm

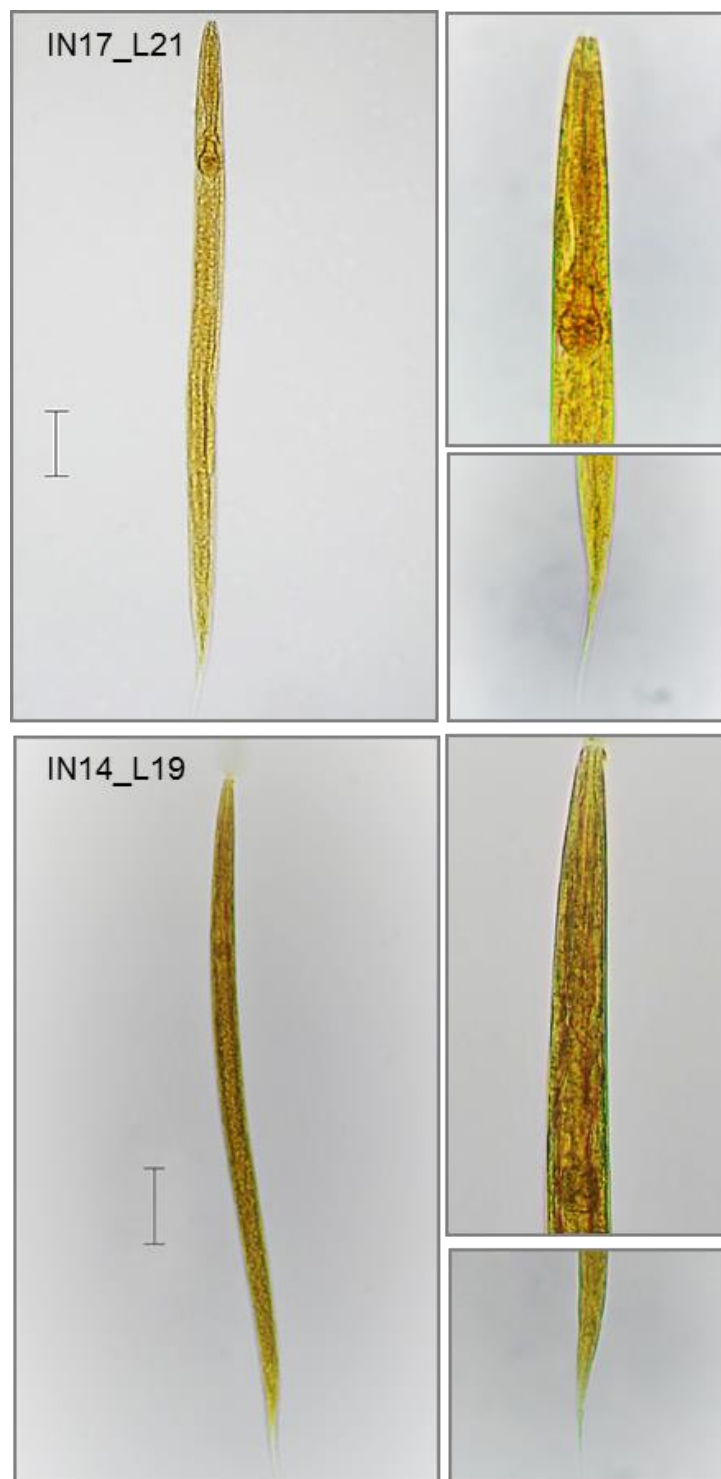


Figura 34: Exemplos de larvas rhabditoides isoladas das amostras sugestivas de ancilostomídeo. Escala = 50µm

5.2.4. Diagnóstico diferencial entre larvas de nematódeos padrões e larvas de nematódeos sugestivas de risco detectadas nas amostras de alface

As Figuras 35 e 36 apresentam comparativamente as principais estruturas morfológicas da extremidade anterior de larvas rabditoides e filarioides de *S. stercoralis*, *S. venezuelensis* e ancilostomídeos e larvas de primeiro e terceiro estágio de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* consideradas para o diagnóstico diferencial com as larvas detectadas nas amostras de alface.



Figura 35: Comparação da extremidade anterior de larvas rabditoide de **(A)** *S. stercoralis*, **(B)** *S. venezuelensis* e **(C)** ancilostomídeo, demonstrando o vestíbulo bucal (vb) e o esôfago do tipo rabditoide, composto de corpo (c), istmo (i) e bulbo (b) e larvas de primeiro estágio (L1) de **(D)** *A. cantonensis* e **(E)** *A. costaricensis*, demonstrando o esôfago do tipo claviforme com corpo (c) e bulbo (b).

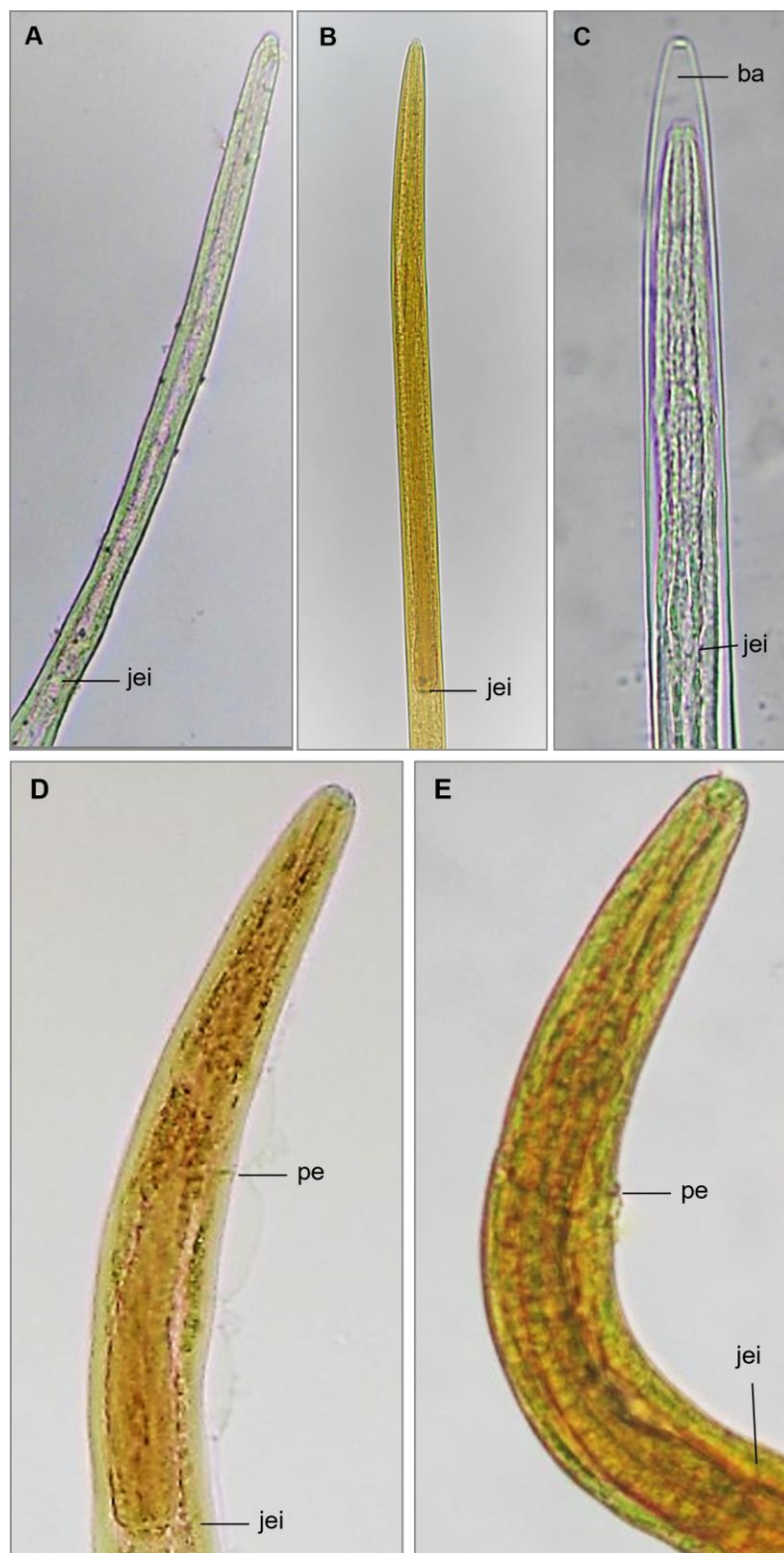


Figura 36: Comparação da extremidade anterior de larvas filarioides de **(A)** *S. stercoralis*, **(B)** *S. venezuelensis* e **(C)** ancilostomídeo, demonstrando o esôfago do tipo filarioide e larvas de terceiro estágio (L3) de **(D)** *A. cantonensis* e **(E)** *A. costaricensis*, demonstrando a bainha (ba), poro extrecor (pe) e junção esôfago-intestino (jei)

As figuras 37 e 38 apresentam comparativamente as principais estruturas morfológicas da extremidade posterior de larvas rabditoides e filarioides de *S. stercoralis*, *S. venezuelensis* e ancilostomídeos e larvas de primeiro e terceiro estágio de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* consideradas para o diagnóstico diferencial com as larvas isoladas no estudo.

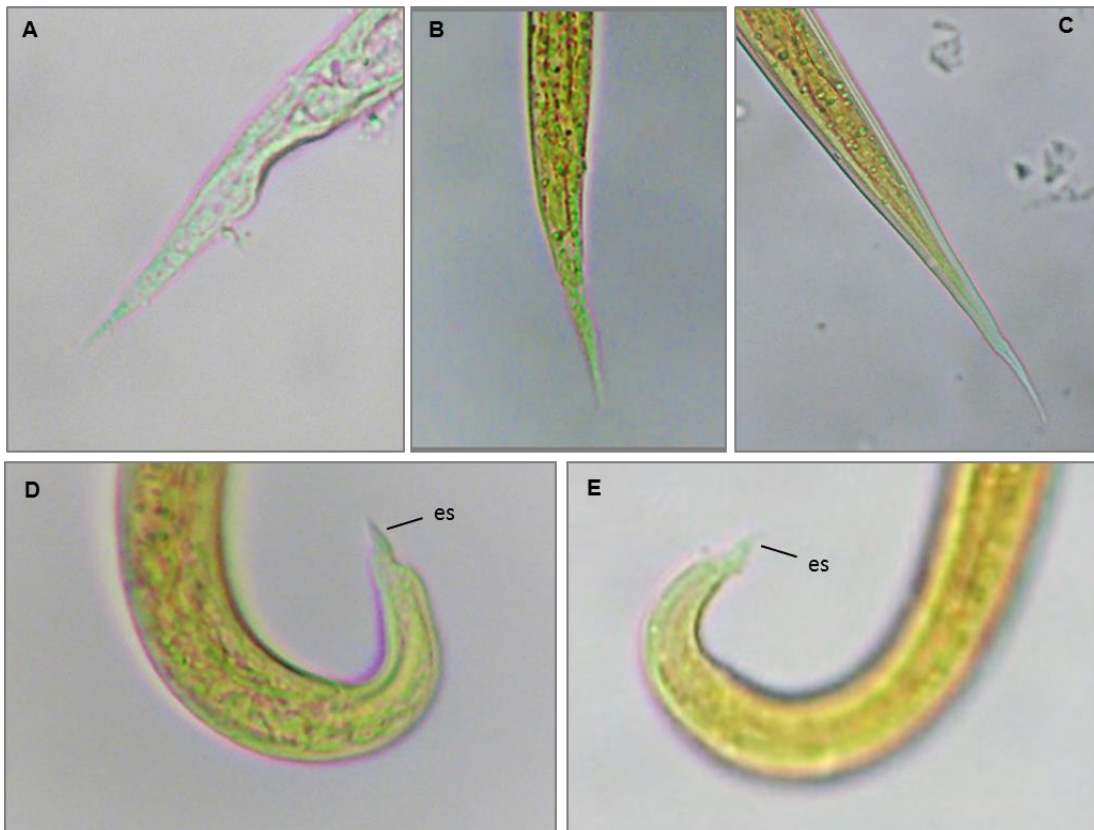


Figura 37: Comparação da extremidade posterior de larvas rabditoides de **(A)** *S. stercoralis*, **(B)** *S. venezuelensis* e **(C)** ancilostomídeo, e larvas de primeiro estágio (L1) de **(D)** *A. cantonensis* e **(E)** *A. costaricensis*, demonstrando a espícula (es)



Figura 38: Comparação da extremidade posterior de larvas filarioides de **(A)** *S. stercoralis*, **(B)** *S. venezuelensis* e **(C)** ancilostomídeo, demonstrando o entalhe apical (ea) e larvas de terceiro estágio (L3) de **(D)** *A. cantonensis* e **(E)** *A. costaricensis*, demonstrando a espícula

As principais características morfológicas e o intervalo de variação dos parâmetros morfométricos das larvas padrão de *S. stercoralis*, *S. venezuelensis* e ancilostomídeos utilizadas para o diagnóstico diferencial estão apresentadas comparativamente nas Tabelas 16 e 17 para larvas rabditoides e filarioides, respectivamente.

Tabela 16: Características morfológicas e morfométricas de larvas rabditoides de *S. stercoralis*, *S. venezuelensis* e ancilostomídeos, com intervalo de variação dos parâmetros adotados (µm)

Larvas rabditoides				
	<i>S. stercoralis</i>	<i>S. venezuelensis</i> (L1)	<i>S. venezuelensis</i> (L2)	Ancilostomídeos
Extremidade anterior	arredondada	arredondada	arredondada	arredondada
Vestíbulo bucal	curto	curto	curto	longo
Tipo de esôfago	Rhabditiforme	Rhabditiforme	Rhabditiforme	Rhabditiforme
Cutícula	lisa	lisa	lisa	finas estrias
Extremidade posterior	reta, afilada	reta, afilada	reta, afilada	longa, afilada
Terminação da cauda	pontiaguda	pontiaguda	pontiaguda	pontiaguda
Primórdio genital	alongado, oval, visível	alongado, oval, visível	alongado, oval, pouco evidente	pequeno, oval, pouco evidente
CTC	236,77 - 299,92	201,22 - 265,67	442,49 - 576,91	328,00 - 695,78
CE	70,91 - 86,07	68,08 - 86,14	90,01 - 120,48	80,24 - 147,43
LC	13,61 - 17,01	10,99 - 15,88	16,78 - 23,77	16,03 - 29,89
DAC	37,65 - 47,84	29,20 - 37,84	55,10 - 77,35	65,95 - 105,47
DPGC	88,96 - 123,17	87,46 - 117,98	172,04 - 264,54	253,05 - 283,02
CVB	2,73 - 4,98	2,95 - 6,07	3,41 - 6,30	10,18 - 18,06
LEA	7,36 - 9,57	5,87 - 8,04	6,20 - 8,66	9,02 - 15,87
CPG	11,84 - 20,73	2,12 - 3,49	11,85 - 24,29	8,82 - 11,03
LPG	3,55 - 6,07	2,55 - 5,19	2,12 - 8,12	2,68 - 3,62

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; CVB: comprimento do vestibulo bucal; LEA: largura da extremidade anterior; CPG: comprimento do primórdio genital e LPG: largura do primórdio genital

Tabela 17: Características morfológicas e morfométricas de larvas filarioides de *S. stercoralis*, *S. venezuelensis* e ancilostomídeos, com intervalo de variação dos parâmetros adotados (µm)

	Larvas filarioides		
	<i>S. stercoralis</i>	<i>L3 S. venezuelensis</i>	Ancilostomídeos
Extremidade anterior	arredondada	arredondada	arredondada
Vestíbulo bucal	ausente	ausente	ausente
Tipo de esôfago	Filariforme	Filariforme	Filariforme
Cutícula	lisa	lisa	finas estrias
Extremidade posterior	reta, afilada	reta, afilada	afilada, com bainha
Terminação da cauda	com entalhe apical	com entalhe apical	pontiaguda
Primórdio genital	pouco evidente	não evidente	pouco evidente
CTC	425,68 - 483,73	433,21 - 547,78	480,76 - 685,59
CE	123,83 - 211,09	160,87 - 196,69	103,69 - 167,85
LC	11,01 - 14,24	12,95 - 19,26	11,02 - 28,64
DAC	44,07 - 64,05	40,89 - 66,67	55,83 - 92,78
DPGC	148,35 - 204,84	-	224,29 - 267,99
LEA	6,02 – 9,12	5,25 – 7,08	6,50 – 17,18

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DAC: distância do ânus a cauda; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; LEA: largura da extremidade anterior

As tabelas 18 e 19 apresentam, comparativamente, as principais características morfológicas e o intervalo de variação dos parâmetros morfométricos das larvas padrão de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*.

Tabela 18: Comparação das características morfológicas e morfométricas de larvas de primeiro estágio (L1) de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, com intervalo de variação dos parâmetros adotados (μm)

Larvas de primeiro estágio (L1)		
	<i>A. cantonensis</i>	<i>A. costaricensis</i>
Extremidade anterior	arredondada	arredondada
Vestíbulo bucal	ausente	ausente
Tipo de esôfago	reto, longo, claviforme	reto, longo, claviforme
Extremidade posterior	curta, curva	curta, curva
Terminação da cauda	ponta fina com espícula	ponta fina com espícula
Primórdio genital	não evidente	não evidente
Cutícula	finas estrias transversais	finas estrias transversais
CTC	206,73 - 291,35	201,99 - 243,96
CE	101,33 - 136,12	97,8 - 114,40
LC	10,67 - 13,81	9,38 - 12,91
DAC	14,86 - 25,19	17,69 - 25,12

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DAC: distância do ânus a cauda

Tabela 19: Comparação das características morfológicas e morfométricas de larvas de terceiro estágio (L3) de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, com intervalo de variação dos parâmetros adotados (μm)

Larvas de terceiro estágio (L3)		
	<i>A. cantonensis</i>	<i>A. costaricensis</i>
Vestíbulo bucal	ausente	ausente
Tipo de esôfago	reto, longo, claviforme	reto, longo, claviforme
Extremidade posterior	curta, curva	curta, curva
Terminação da cauda	ponta fina com espícula	ponta fina com espícula
Primórdio genital	oval, evidente	oval evidente
Cutícula	finas estrias transversais	finas estrias transversais
CTC	434,04 - 482,66	413,69 - 489,92
CE	162,17 - 182,68	143,8 - 160,24
LC	22,76 - 32,99	22,45 - 28,53
DPE	81,11 - 97,78	75,7 - 95,31
DAC	31,36 - 46,92	19,89 - 36,92
DPGC	136,02 - 174,52	132,66 - 166,39

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPE: distância do poro excretor; DAC: distância do ânus a cauda; DPGC: distância do primórdio genital a cauda

As figuras 39, 40 e 41 apresentam comparativamente a extremidade anterior, o primórdio genital e a extremidade posterior de larvas rabditoides de *S. stercoralis* (A), de *S. venezuelensis* (B) e de larvas isoladas das amostras de alface, sugestivas para o gênero *Strongyloides*.

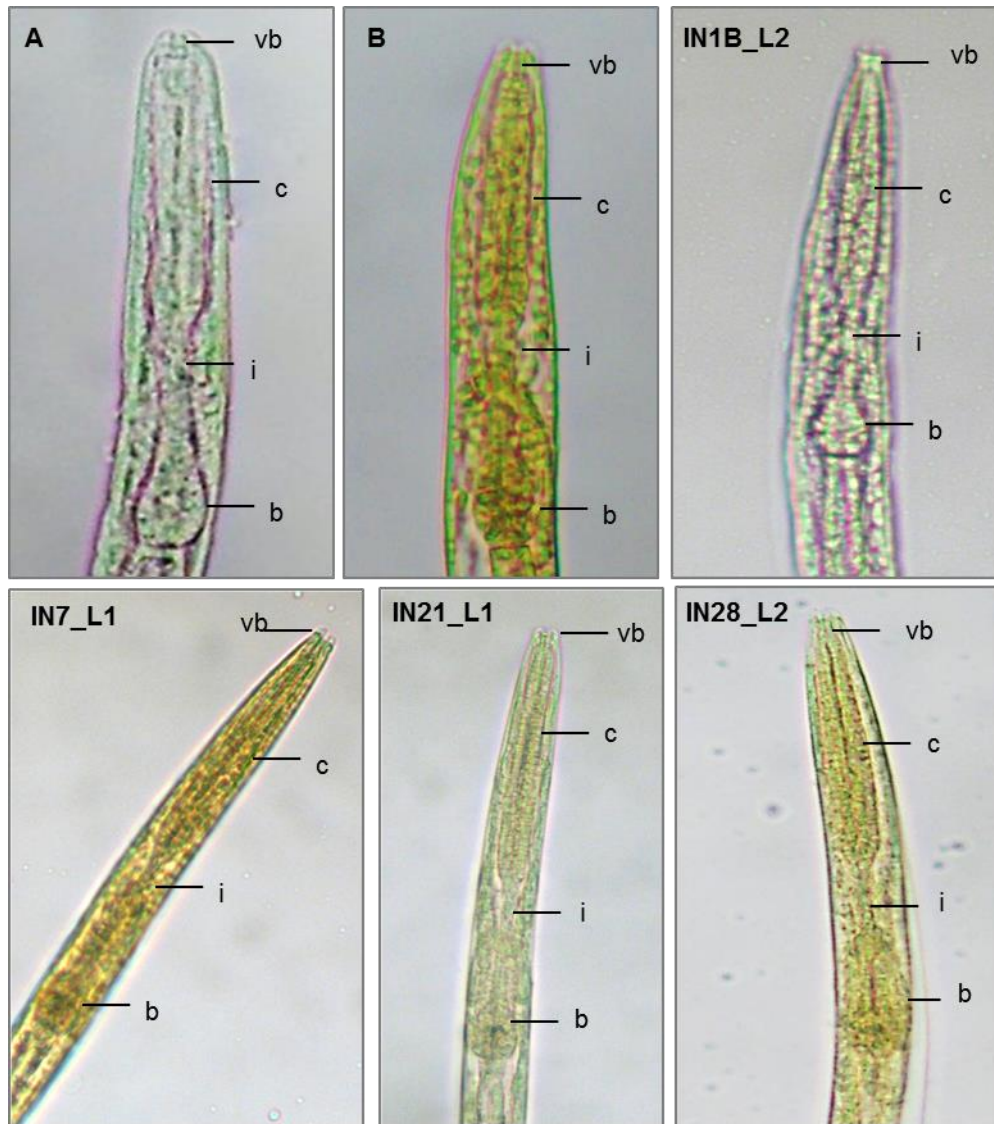


Figura 39: Comparação da extremidade anterior de larvas rabditoides de *S. stercoralis* (A), *S. venezuelensis* (B) e larvas isoladas das amostras (IN1B_L2; IN7_L1; IN28_L2 e IN21_L1), demonstrando o vestibulo bucal (vb) e o esôfago do tipo rabditoide, composto de corpo (c), istmo (i) e bulbo (b)

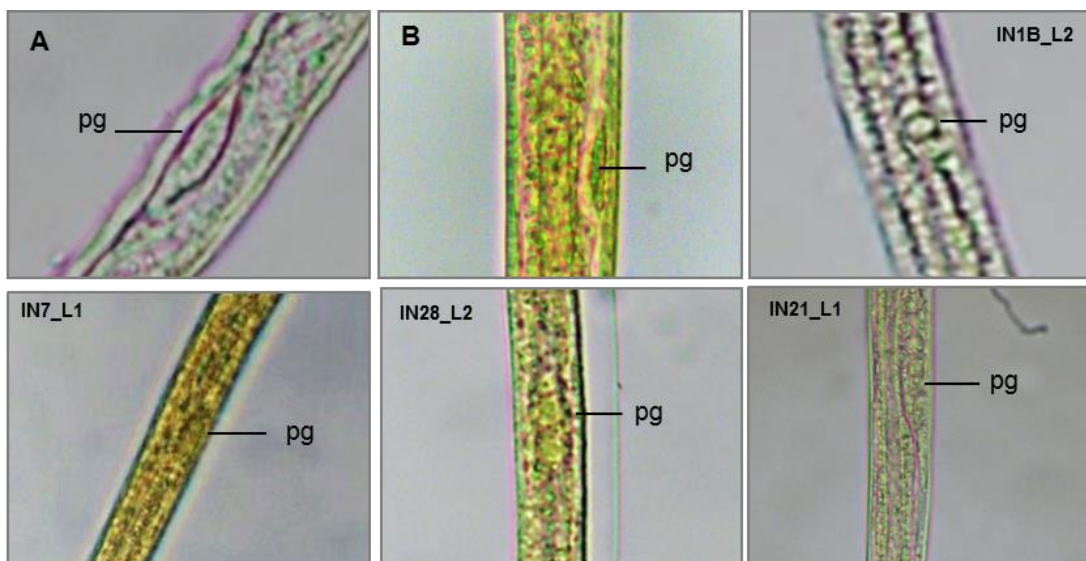


Figura 40: Comparação do primórdio genital (**pg**) de larvas rabditoides de *S. stercoralis* (**A**), *S. venezuelensis* (**B**) e larvas isoladas das amostras (**IN1B_L2**; **IN7_L1**; **IN28_L2** e **IN21_L1**).

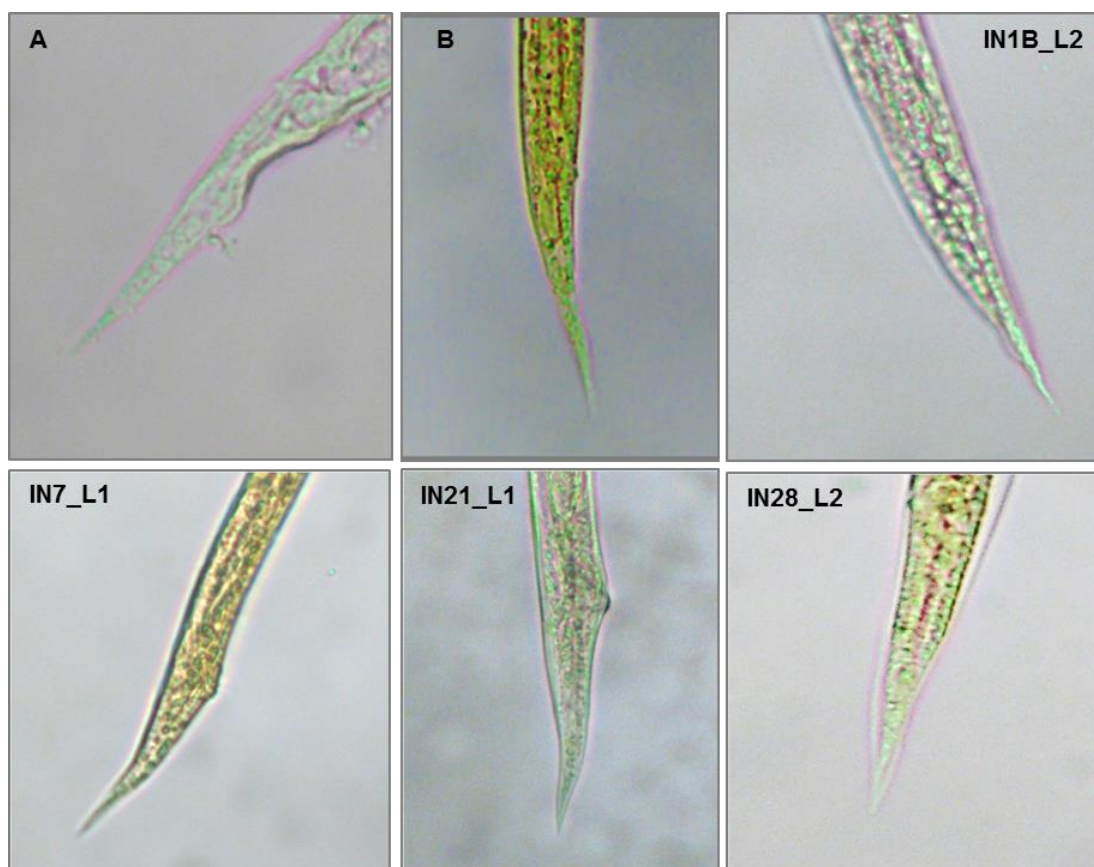


Figura 41: Comparação da extremidade posterior de larvas rabditoides de *S. stercoralis* (**A**), *S. venezuelensis* (**B**) e larvas isoladas das amostras (**IN1B_L2**; **IN7_L1**; **IN21_L1** e **IN28_L2**).

As larvas sugestivas de pertencerem ao gênero *Strongyloides* foram submetidas ao estudo de similaridade por comparação de suas medidas com o intervalo de variação morfométrica de larvas rabditoides de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis*. Estes resultados estão apresentados nas Tabelas 20 e 21 e demonstram que, embora alguns parâmetros estejam dentro do intervalo de variação das larvas padrões, indicado pelo score 1, o percentual de similaridade de todas as larvas analisadas foi inferior a 80%, tanto em relação as larvas de *S. stercoralis*, quanto de *S. venezuelensis*, indicando baixa similaridade fenotípica.

Tabela 20 – Estudo de similaridade por entre larvas rabditoides isoladas das amostras de alface e larvas rabditoides de *S. stercoralis*

nº larva	Características morfométricas									Total	N	% similaridade
	CTC	CE	L	DAC	DPGC	CVB	LEA	CPG	LPG			
IN 1 B_2	1	1	1	0	1	1	0	0	1	6	9	67
IN 1 B_6	0	0	1	1	0	0	1	1	0	4	9	44
IN1 B_13	0	0	0	1	0	0	1	1	0	3	9	33
IN1 B_14	0	0	1	1	0	1	0	1	0	4	9	44
IN1 B_22	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	9	22
IN1 B_23	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	9	22
IN1 B_27	0	0	0	1	0	1	0	1	0	3	9	33
IN1 B_33	1	0	1	0		0	0	1	1	4	8	50
IN 7_1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	4	9	44
IN 21_1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	9	22
IN 28_2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	3	9	33

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DAC: distância do ânus a cauda; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; CVB: comprimento do vestíbulo bucal; LEA: largura da extremidade anterior; CPG: comprimento do primórdio genital e LPG: largura do primórdio genital

Tabela 21 – Estudo de similaridade entre larvas rabditoides isoladas das amostras de alface e larvas rabditoides de *S. venezuelensis*

nº larva	Características morfométricas									Total	N	% similaridade
	CTC	CE	L	DAC	DPGC	CVB	LEA	CPG	LPG			
IN 1 B_2	1	1	1	0	1	1	0	0	1	6	9	67
IN 1 B_6	1	1	1	1	1	0	1	1	0	7	9	78
IN1 B_13	1	1	1	1	1	0	1	1	0	7	9	78
IN1 B_14	1	1	1	1	1	1	0	1	0	7	9	78
IN1 B_22	1	1	0	1	1	1	0	0	1	6	9	67
IN1 B_23	1	1	0	1	1	1	0	0	1	6	9	67
IN1 B_27	1	1	0	1	1	1	0	1	0	6	9	67
IN1 B_33	1	1	1	0		0	0	1	1	5	8	63
IN 7_1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	7	9	78
IN 21_1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	5	9	56
IN 28_2	1	1	0	1	1	0	0	1	0	5	9	56

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; CVB: comprimento do vestíbulo bucal; LEA: largura da extremidade anterior; CPG: comprimento do primórdio genital e LPG: largura do primórdio genital

Após análise comparativa detalhada, as diferenças morfológicas verificadas nas larvas consideradas sugestivas para *Strongyloides*, principalmente, em relação a extremidade anterior, disposição do esôfago e formato do primórdio genital, associadas ao baixo percentual de similaridade permitiram concluir que os exemplares isolados não pertencem as espécies padrão para esse gênero.

As Figuras 42 e 43 apresentam, respectivamente, detalhes das estruturas morfológicas das extremidades anterior e posterior de larva rabditoide de ancilostomídeo em comparação com larvas isoladas das amostras de alface, sugestivas para este grupo.

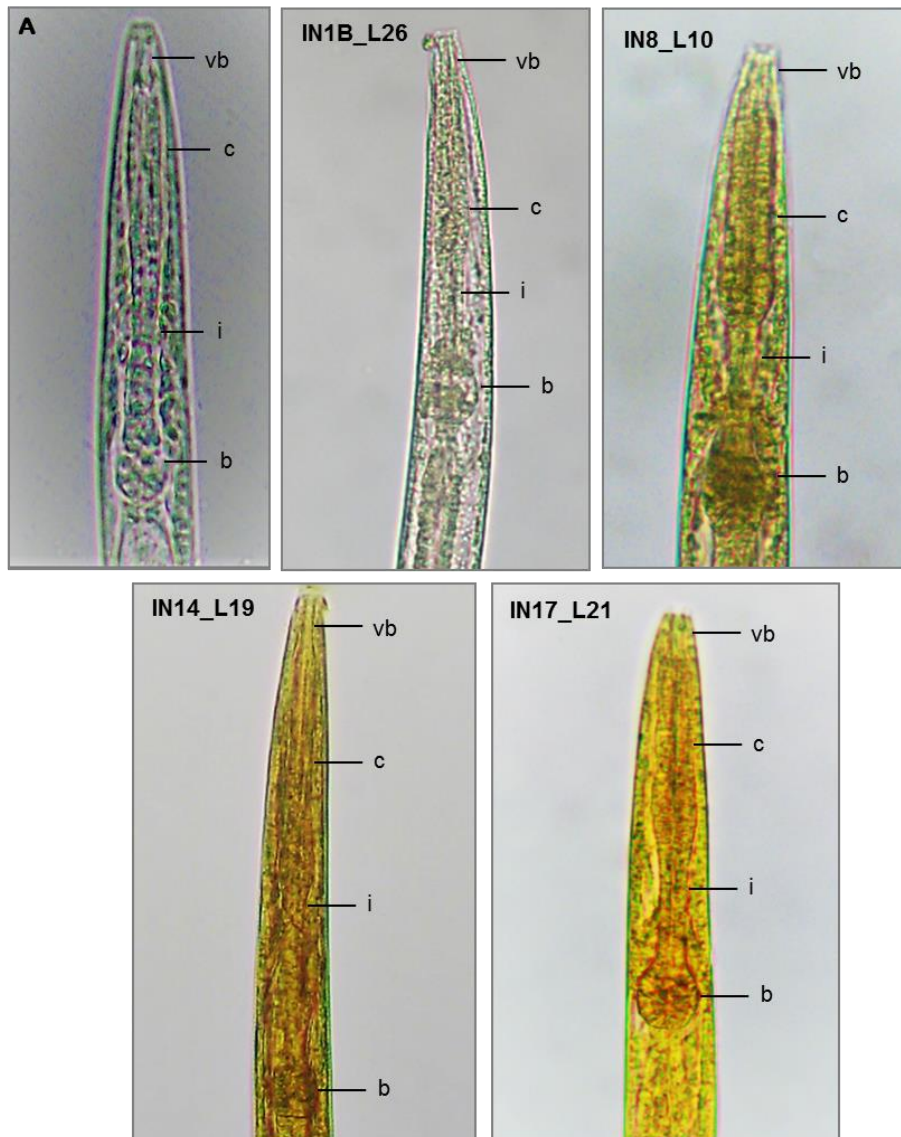


Figura 42: Comparação da extremidade anterior de larvas rabditoides de ancilostomídeo (A) e larvas isoladas das amostras (IN1B L26; IN8 L10; IN14 L19 e IN17 L21), demonstrando o vestibulo bucal (vb) e o esôfago do tipo rabditoide, composto de corpo (c), istmo (i) e bulbo (b)

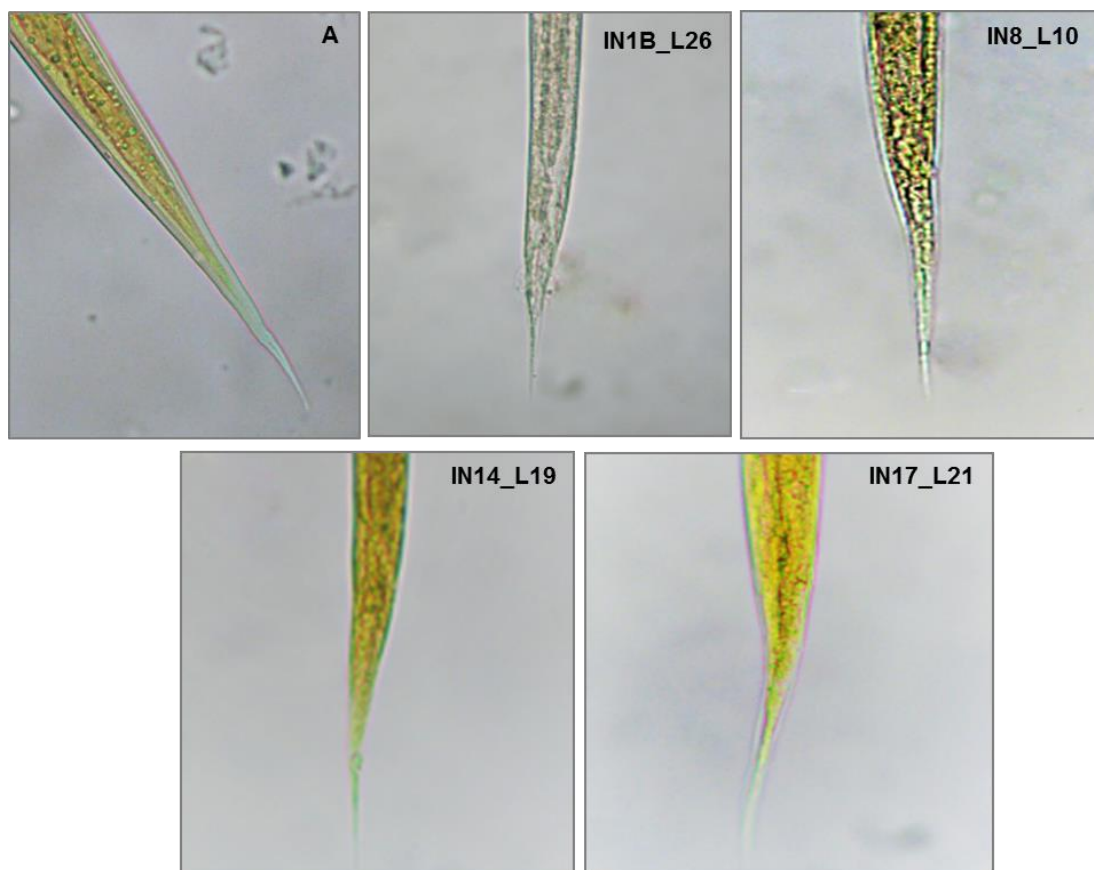


Figura 43: Comparação da extremidade posterior de larvas rabditoides de ancilostomídeos **(A)** e larvas isoladas das amostras **(IN1B_L26; IN8_L10; IN14_L19 e IN17_L21)**

Os resultados do estudo morfométrico das larvas sugestivas de ancilostomídeos estão apresentados na tabela 22. Destas, uma apresentou similaridade de 83% (IN8_10) e duas apresentaram 100% de similaridade (IN B_26 e IN 17_21), pois os parâmetros morfométricos avaliados encontraram-se dentro do intervalo de variação das larvas padrões, principalmente CTC, CE e LC. Entretanto, nestes três casos, não foram obtidas medidas relacionadas ao primórdio genital, como DPGC, CPG e LPG, pois esta estrutura não estava visível.

Tabela 22 – Estudo de similaridade entre larvas rabditoides isoladas das amostras de alface e larvas rabditoides de ancilostomídeos

nº larva	Características morfométricas									Total	n	% similaridade
	CTC	CE	L	DAC	DPGC	CVB	LEA	CPG	LPG			
IN 1 B_8	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3	9	33
IN1 B_26	1	1	1			1	1			5	5	100
IN 8_9	1	1	1	0		0	1			4	6	67
IN 8_10	1	1	1	1		0	1			5	6	83
IN 13_5	1	1	1	0		0	0			3	6	50
IN 14_19	1	0	1	1		0	0			3	4	75
IN 14_96	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3	9	33
IN 15_50	0	1	0	0	0	1	0	1	1	4	9	44
IN 17_19	1	1	1	0	0	1	1	0	0	5	9	56
IN 17_21	1	1	1			1	1			5	5	100

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; CVB: comprimento do vestibulo bucal; LEA: largura da extremidade anterior; CPG: comprimento do primórdio genital e LPG: largura do primórdio genital

As diferenças morfológicas observadas na análise comparativa, referentes a extremidade anterior e a disposição das estruturas esofágicas, e os resultados do estudo de similaridade, permitiram concluir que esses exemplares não pertencem ao grupo padrão de ancilostomídeos, ainda que algumas larvas tenham apresentado alta similaridade morfométrica, pois estas não apresentaram as medidas de todos os parâmetros avaliados.

5.3. Aplicação da legislação sanitária

Das 30 amostras de alface higienizadas analisadas, apenas 6 não apresentaram nenhum tipo de matéria estranha e estavam em conformidade com a ANVISA RDC nº 14 (Brasil, 2014).

Devido à presença de matérias estranhas como ovos, larvas e fragmentos de insetos, insetos inteiros, ácaros, rotíferos e nematódeos, 80% das amostras se encontraram insatisfatórias por Falhas nas Boas Práticas. Destas, 54% continham nematódeos vivos ou mortos, porém não foram detectados exemplares associados a agravos a saúde humana.

Os achados dessas amostras estão apresentados detalhadamente no Anexo 18.

6. Discussão

Os frequentes encontros de estruturas parasitárias em amostras de hortaliças, descritas na literatura (Adenusi et al., 2015; Balarak et al., 2016; Lass et al., 2016; Silva et al., 2018), implicam na necessidade de vigilância e controle sanitário contínuos desses alimentos, visto o potencial de risco à saúde humana que podem oferecer, especialmente a alface, objeto do presente estudo, uma vez que se trata de uma hortaliça de grande popularidade, consumida principalmente na forma crua, cujo único tratamento entre o cultivo e o consumo é a higienização (Mogharbel e Masson, 2005; Henz e Suinaga, 2009; Maldonade et al., 2014).

Entre os helmintos detectados nas hortaliças, são comuns os relatos da presença de larvas de nematódeos, tanto de vida livre, quanto parasitárias (Silva et al., 2016; Luz et al., 2017; Silva et al., 2018), e a avaliação dessa ocorrência envolve uma abordagem ecológica e médica, de caráter multidisciplinar. A importância médica se deve a presença de espécies com potencial de causarem infecções (Hotez, 2008), e ambiental, pelo fato desses micro-organismos atuarem como bioindicadores da qualidade do solo e da água de irrigação dos locais de cultivo (Ritzinger et al., 2010; Ferraz e Brown, 2016).

Na prática laboratorial, a identificação de nematódeos é bastante complexa e dificultosa, dada a diversidade do grupo. A literatura é vasta no que se refere à identificação de vermes adultos, tanto de vida livre como de interesse médico, contudo a identificação dos seus estágios larvares, infectantes ou intermediários, ainda é um grande desafio, principalmente no caso de amostras ambientais (Little, 1966; Miné, 2009; Ferraz e Brown, 2016). Para a correta identificação desses nematódeos, e o entendimento de seus complexos ciclos de vida, é necessário um estudo aprofundado de sua ecologia e morfologia.

O presente estudo buscou utilizar recursos da parasitologia médica para auxiliar na identificação e, sobretudo, no diagnóstico diferencial, entre larvas de nematódeos de interesse médico e larvas de outras espécies de

ocorrência no solo por meio do desenvolvimento e comparação de padrão morfométrico de estágios larvares de *S. stercoralis*, *S. venezuelensis*, ancilostomídeos, *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, com a finalidade de aumentar a segurança e confiabilidade dos resultados analíticos.

A complexidade na identificação de larvas de nematódeos estimulou diversos autores a recorrerem à combinação de dados morfométricos como ferramenta para a diferenciação de espécies, como Little (1966), que comparou seis espécies de *Strongyloides* em busca de critérios para identificação específica; Ash (1970), para discriminação de larvas de terceiro estágio de quatro vermes pulmonares de ocorrência em moluscos; Joachim et al. (1999), para diferenciação de larvas L4 de *Oesophagostomum dentatum* e *O. quadrispinulatum* recuperadas de suínos; van Wyk et al. (2004) para diagnóstico diferencial de larvas de nematódeos comuns isolados de bovinos, ovinos e caprinos; Mota et al. (2020) para identificação de larvas L3 de *A. cantonensis* isoladas de molusco; entre outros.

Os parâmetros morfométricos utilizados para os padrões no presente estudo se basearam nas observações de Ash (1970) para identificação de larvas de terceiro estágio de metastrongilídeos em moluscos, entre eles *A. cantonensis*, e foram extrapolados para as demais larvas de nematódeos de interesse médico que formaram o padrão deste estudo na tentativa de auxiliar no diagnóstico diferencial, porém, para algumas espécies esses parâmetros pareceram não ser os mais adequados, dada as especificidades morfológicas dos estágios larvares de cada gênero, que precisaram ser individualmente analisadas. Por esta razão, no decorrer do estudo, foram adicionados os parâmetros relacionados a extremidade anterior e ao primórdio genital para as larvas do gênero *Strongyloides* e para os ancilostomídeos, baseado nos parâmetros adotados por Miné (2009), em estudo com *S. stercoralis*.

Ash (1970) utilizou a combinação de medidas de tamanho juntamente com características morfológicas da terminação da cauda para a distinção entre as espécies, diante da dificuldade de discriminação por meio exclusivo de análise de caracteres morfológicos. O autor observou uma

ampla variedade no tamanho das larvas de uma mesma espécie, constatando a importância das medições serem realizadas em um grupo de larvas, pois uma única medida não seria um critério suficiente para a precisa identificação; assim como verificou a necessidade da análise multivariada dos parâmetros, uma vez que as medidas isoladas não se mostraram uma característica segura.

A discriminação entre espécimes a partir de características morfométricas pode ser realizada por meio de testes estatísticos de comparação entre os parâmetros por correlação e variância, análises canônicas discriminantes e análises estatísticas multivariadas como de componentes principais e associações de similaridade por taxonomia numérica.

A associação por taxonomia numérica ou fenética consiste em uma análise multivariada que visa à determinação da similaridade entre grupos de larvas com características morfológicas comuns, por aplicação de escores para características observáveis e mensuráveis. Trata-se de uma ferramenta taxonômica importante e de baixo custo, comentada e incentivada por Moss e Webster (1970) para aplicação em sistemática de nematoides. Este método foi demonstrado por Rocco (2007) e por Mota (2018), que recentemente confirmou a sua aplicabilidade diagnóstica na separação de grupos de larvas de *Angiostrongylus* spp isoladas de moluscos. Estas publicações motivaram a aplicação da análise de similaridade fenotípica por escores no presente estudo.

As larvas filarioides de *S. stercoralis* do presente estudo apresentaram valores médios dentro do intervalo de variação descrito para o gênero *Strongyloides* por Little (1966) para os parâmetros CTC, LC, CE e DAC, porém inferiores aos apresentados pelo autor para larvas rabditoides e filarioides de *S. stercoralis*. Em relação aos dados apresentados por Teixeira (1997) e por Miné (2009), em estudo morfométrico de larvas rabditoides e filarioides de *S. stercoralis* isoladas de diversos pacientes com estrongiloidíase, os valores médios das larvas de *S. stercoralis* padrões também se mostraram inferiores, com exceção do parâmetro CVB,

semelhante ao obtido por Miné (2009) e da medida de DAC verificada por Teixeira (1997) em larvas filarioides.

As larvas de *S. venezuelensis* padrão apresentaram dados morfométricos dentro do intervalo de variação apresentado por Little (1966) para a espécie, em relação aos parâmetros CTC e DAC, e inferiores quanto aos parâmetros de CE e LC. Em comparação aos dados obtidos por Tobar et al (2021), as larvas rabditoides L1 e filarioides L3 do padrão apresentaram valores médios de CTC e LC inferiores, enquanto as larvas L2 apresentaram esses valores médios superiores.

Entre as hipóteses possíveis para as diferenças nos dados morfométricos dos estudos, destaca-se a dificuldade de padronização exata dos estágios larvares, uma vez que as larvas permanecem em processo de desenvolvimento e crescimento contínuo. Em condições favoráveis de umidade, temperatura e disponibilidade de alimento, as transições entre os estágios larvares de *Strongyloides* spp. podem ocorrer em curto período de tempo, entre 24 a 36 horas evoluem de larvas rabditoides a filarioides infectantes no ciclo direto, e no ciclo indireto passam de larvas rabditoides a adultos de vida livre entre 24 a 30 horas (Pessoa, 1981; Cimerman, B. e Cimerman, S., 2001).

As larvas rabditoides de *S. stercoralis* utilizadas nos estudos de Teixeira (1997) e Miné (2009) são originárias de amostras fecais de diversos pacientes com estrongiloidíase, que podem agrupar larvas rabditoides L1 e L2 ou em fase de transição, enquanto as larvas rabditoides do presente estudo, embora representem uma amostragem reduzida (n=20), foram obtidas de fezes humanas recentes de uma única amostra, de forma que podem ser consideradas larvas rabditoides de 1º estágio. As larvas filarióides de todos os estudos foram originárias de cultura do material fecal em carvão, portanto, as diferenças encontradas podem estar relacionadas ao tempo de cultivo. No caso do *S. venezuelensis*, as larvas de ambos os estudos foram originárias de ciclo experimental, que podem apresentar da mesma forma diferenças no tempo e nas condições de cultivo.

Além disso, foram empregadas diferentes técnicas de mensuração entre os estudos, o que pode determinar variações nos parâmetros morfométricos entre os diferentes estudos. Teixeira (1997) realizou desenhos em câmara clara e obteve as medidas por meio de curvímeter, enquanto Mine (2009) e Tobar et al (2021) utilizaram microscópio ótico acoplado a câmeras fotográficas para a captura das imagens, e os softwares Motic Images Advanced 3.2 e Motic Images Plus 2.0, respectivamente, para a medição. No presente estudo também foi utilizado microscópio óptico com câmera acoplada para a captura das imagens e o software Zeiss Axio Vision LE, para as mensurações. Assim, é possível também que estas variações ocorram entre os diferentes sistemas ópticos, de captura de imagens e de softwares usados para a finalidade.

Entre as duas espécies de *Strongyloides* dos padrões, *S. stercoralis* e *S. venezuelensis*, a avaliação de similaridade por escores foi superior a 80%, tanto para larvas rabditoides quanto filarioides, quando adotados os parâmetros comuns as demais larvas (CTC, CE, LC e DAC). Possivelmente esses parâmetros são insuficientes para permitir diferenciação morfológica específica para esse gênero, tornando-se necessária a associação com outros parâmetros para aumentar a eficiência na separação entre os dois grupos. Após a inclusão das medidas relacionadas a extremidade anterior (comprimento do vestíbulo bucal e largura da extremidade anterior) e ao primórdio genital (comprimento e largura), a similaridade reduziu para 59% entre as larvas rabditoides e 79% para larvas filarioides, demonstrando que essas características parecem ser importantes na diferenciação entre as duas espécies de *Strongyloides* estudadas. Não foram encontrados estudos de avaliação de similaridade por escores em espécies do gênero *Strongyloides* para fins de comparação com os resultados do presente estudo.

Comparações morfométricas por análises de correlações estatísticas entre espécies do gênero *Strongyloides* foram realizadas por outros autores, como Little (1966), com objetivo de estabelecer critérios de identificação específica por comparação morfológica e biométrica de seis espécies. O

autor afirma que os únicos caracteres de identificação específica são aqueles baseados na morfologia da cavidade bucal e do útero das fêmeas parasitas partenogenéticas ou por características biológicas relacionadas com a presença de ovos larvados ou L1 encontradas em fezes recém-eliminadas pelos hospedeiros. Afirma também que não há características morfológicas e biométricas para L3 que sejam determinantes na identificação específica do gênero *Strongyloides*. Vieira (2006), em concordância com Little (1966), observou semelhanças nos dados biométricos colhidos de larvas de uma espécie de *Strongyloides* sp. isoladas de *Hydrochaeris hydrochaeris* (capivara) com os das demais espécies do gênero *Strongyloides*, confirmando a dificuldade de diferenciação de espécies nesse gênero pela morfometria. Teixeira (1997) e Miné (2009) realizaram análises estatísticas através da técnica de componentes principais, visando à identificação de cepas, e utilizaram os mesmos parâmetros morfométricos do presente estudo, sendo que Miné (2009) adotou os parâmetros de comprimento do vestíbulo bucal, comprimento do primórdio genital e área do primórdio genital para larvas rabditoides. Ambos concluíram que a análise morfométrica isoladamente não permitiu a identificação de cepas.

Os resultados de Little (1966) e Vieira (2006) ressaltam a dificuldade de diferenciação de espécies por características morfológicas dentro do gênero *Strongyloides*, no entanto, os dados do presente estudo sugerem que há uma possibilidade de diferenciação entre larvas de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* pelas características da extremidade anterior, e pelas medidas de comprimento e largura do primórdio genital, principalmente para larvas rabditoides L1, que não foram adotadas por esses autores. No caso das larvas filarioides, o parâmetro de largura da extremidade anterior se mostrou promissor, embora sejam necessárias maiores investigações para uma conclusão efetiva.

Com relação aos ancilostomídeos, em virtude da dificuldade de obtenção de amostras de fezes humanas de pacientes portadores de ancilostomíase no período do estudo, o padrão morfométrico foi

desenvolvido a partir de um pool de larvas obtidas de material fecal canino, que se tratam, possivelmente, de *A. caninum*, *A. brasiliense* ou *A. ceylanicum*, sendo *A. caninum* a espécie mais comum em cães (Burrows, 1962). A semelhança nas médias dos parâmetros CTC, LC e DAC das larvas filarioides do padrão com as larvas infectantes de *A. caninum* descritas por Nichols (1956) permitem sugerir que essa seja a espécie mais provável das larvas padrão, porém por se tratar de pool de larvas, pode haver outras espécies envolvidas. O parâmetro CE do padrão se apresentou inferior ao apresentado por Nichols (1956), que pode ocorrer devido à diferença no tempo de cultivo.

Ao se comparar os resultados morfométricos médios das larvas filarioides do presente estudo com os dados apresentados por Yoshida (1971), para larvas infectantes de *A. brasiliense*, *A. ceylanicum* e *A. duodenale*, originadas de cães experimentalmente infectados, as larvas padrões apresentaram medidas inferiores para os parâmetros de CTC, CTM e CE em relação a todas as espécies. O parâmetro LC do padrão foi semelhante ao das demais larvas descritas por Yoshida (1971), e alguns espécimes do padrão apresentaram valores de CE e DAC aproximados com os de *A. brasiliensis*, que foram menores em todos os parâmetros em relação a *A. ceylanicum* e *A. duodenale*.

Em comparação com os dados morfométricos de larvas filarióides de *A. duodenale* e *Necator americanus*, extraídas de fezes humanas, descritos por Correia et al. (1979), as larvas filarioides do padrão apresentaram valores médios também inferiores para os parâmetros de CTC e LC, com parte dos exemplares apresentando medidas de CTC aproximadas as descritas para as duas espécies.

Devido à ausência de larvas de ancilostomídeos de origem humana no período do estudo, não foi realizada avaliação de similaridade fenotípica para esse gênero que possibilitasse avaliar a capacidade de separação de grupos pelos parâmetros morfométricos. Contudo, segundo a literatura consultada, há a possibilidade de diferenciação específica de larvas infectantes de algumas espécies de ancilostomídeos por meio da associação

de características morfológicas, como formato da extremidade anterior, visibilidade das estrias transversais da cutícula e formato da ponta da cauda, e também morfométricas como comprimento, largura, distância do ânus a cauda e distância da ponta do corpo à ponta da bainha da larva (Kobayashi, 1928; Yoshida, 1971; Correia, 1979; Zhong-xing e Wi-xin, 2018). Na revisão da literatura realizada, não foram encontrados dados de larvas rabditóides de ancilostomídeos para comparação com os achados do presente estudo.

No gênero *Angiostrongylus*, os dados morfométricos obtidos de larvas L3 de *A. cantonensis* estão em concordância com os isolados de referência de Ash (1970) e Mota (2018), para todos os parâmetros avaliados, e demonstraram menor variação entre as medidas em relação a esses estudos para a maioria dos parâmetros (menor desvio padrão). Os valores médios também estão dentro do intervalo de variação das larvas infectantes identificadas por Mota et al. (2020), obtidas de infecção natural de moluscos. Igualmente, os dados dos padrões de larvas L3 de *A. costaricensis* foram compatíveis com os das cepas de referência apresentados por Rocco (2007) e por Mota (2018). As cepas padrões de *A. costaricensis* utilizadas por Rocco (2007) e Mota (2018), e de *A. cantonensis* de Mota (2018) foram obtidas de ciclo experimental mantido no Laboratório de Enteroparasitoses do Instituto Adolfo Lutz, assim como no presente estudo.

Entre *A. cantonensis* e *A. costaricensis* foi encontrado percentual de similaridade de 48% para larvas L1 e de 76% para larvas L3, sendo que nestas últimas (L3), o parâmetro de comprimento de esôfago não apresentou nenhuma similaridade, o que permite maior segurança no uso desse método para diferenciação dessas espécies, pois demonstrou diferenças morfométricas importantes entre elas. Rocco (2007) e Mota (2018) obtiveram sucesso na utilização dessa metodologia para diagnóstico diferencial de larvas de metastrongilídeos isoladas de moluscos morfologicamente compatíveis com *Angiostrongylus* spp. Mota detectou similaridade entre 85% a 99% com isolados de referência L3 de *A. cantonensis* e baixa similaridade para outras espécies do gênero, como *A. costaricensis*. Houve concordância de 100% no diagnóstico morfológico e

molecular de *A. cantonensis*, nos casos com similaridade superior a 85%, confirmando a aplicabilidade diagnóstica da análise de similaridade por escore para esse gênero. Baseado nesses dados e nos resultados do presente estudo é possível realizar a diferenciação específica de larvas L3 de *A. cantonensis* ou *A. costaricensis* pelo estudo morfométrico e análise de similaridade quando apresentarem percentual igual ou superior a 85%.

Em relação a detecção de nematódeos nas amostras de alface *in natura* e higienizadas do presente estudo, foi utilizada a metodologia padronizada por Matosinhos et al. (2016) com modificações, após a verificação da recuperação dos nematódeos, realizada com o objetivo de avaliar a modificação proposta, porém sem a finalidade de reproduzir a validação do método.

Tanto a padronização da metodologia realizada por Matosinhos et al. (2016) como a verificação da eficácia do método neste estudo demonstraram que a técnica analítica empregada, apesar de eficiente, apresentou perdas e variabilidade no número de larvas recuperadas entre os diferentes níveis de contaminação e entre as replicatas realizadas. A média obtida de recuperação de nematódeos, de 76% (± 16), foi superior à de Matosinhos et al. (2016), porém indicou um decréscimo na recuperação no nível de maior concentração de larvas (Tabela 14). O fato das larvas estarem fixadas pode ter contribuído para um maior agrupamento dos espécimes, interferindo na sua distribuição nas folhas do vegetal e levando as perdas observadas.

As diferenças observadas entre os resultados podem estar relacionadas às modificações na técnica original, com a introdução da lavagem e desinfecção das amostras com hipoclorito de sódio, de forma a evitar contaminações prévias. Apesar de terem sido utilizadas amostras higienizadas, assim como fizeram Matosinhos et al. (2016), esta ação pode ter promovido uma redução das sujidades e melhora na visualização das larvas no sedimento. Outro fator que pode ter contribuído para a melhor recuperação dos nematódeos pode ser a observação do referido sedimento ao microscópio estereoscópico, para quantificação e captura das larvas, e

posterior confecção de lâminas e confirmação em microscópio óptico, enquanto Matosinhos et al. (2016) realizaram a avaliação do sedimento e contagem das larvas diretamente em lâminas ao microscópio óptico. Além disso, há a possibilidade de influência da espécie de nematódeo utilizada para a contaminação artificial, pois no presente estudo foram utilizadas larvas filarioides fixadas de *S. venezuelensis*, ao passo que Matosinhos et al. (2016) utilizaram larvas filarioides fixadas de *A. ceylanicum*, embora estas sejam maiores em comparação com *S. venezuelensis*, segundo a literatura (Yoshida, 1971; Tobar et al. 2021).

Não foram encontrados na literatura outros estudos sobre o desempenho de métodos de detecção de larvas de nematódeos em hortaliças, embora uma grande diversidade de técnicas seja utilizada para a pesquisa de parasitos nesse tipo de produto, detectando ovos e larvas de helmintos além de cistos e oocistos de protozoários. Em geral esses métodos são baseados em análises de fezes e água, com etapas de lavagem das hortaliças, com diferentes soluções extratoras, concentração e identificação microscópica das formas parasitárias.

Dependendo da matriz utilizada, a eficiência de recuperação de larvas de nematódeos pode ser diferente. No caso de análises de amostras *in natura*, é esperada uma menor recuperação, pois o sedimento obtido da lavagem apresenta grande quantidade de resíduos vegetais, terra, areia, entre outras sujidades, que dificultam a visualização e captura dos nematódeos, podendo resultar em perdas. Além disso, larvas vivas podem apresentar um desprendimento diferente em relação às larvas fixadas, mas para uma melhor avaliação dessas variáveis são necessários estudos mais controlados. Sendo assim, os resultados da ocorrência de nematódeos nas amostras podem estar subestimados.

Entretanto, embora possam ter ocorrido perdas, foram detectados nematódeos vivos ou mortos em 97% das amostras *in natura*, assim como em 43% das amostras higienizadas. O intervalo de variação mais frequente nos dois tipos de amostras foi de 1 a 10 nematódeos (Figura 22), indicando que esse é, possivelmente, o número mais provável de ocorrência, e o valor

de mediana das amostras *in natura* (6) demonstrou uma quantidade relativamente baixa para essa categoria de produto, apesar de algumas amostras terem apresentado frequência superior a 100 nematódeos.

Observou-se grande variabilidade na ocorrência de nematódeos entre as amostras (Tabela 15), indicada pelo alto valor do desvio padrão (55,9) em relação à média (28,5), e também intra-amostras, demonstrada nos resultados das triplicatas (Anexo 12). Os fatores para a essa variabilidade podem estar relacionados às perdas inerentes à própria metodologia, durante os processos de lavagem ou sedimentação, ou até mesmo em virtude da capacidade de detecção visual do analista. Além disso, há variações decorrentes da composição da microflora vegetal relacionada, tanto a fatores ambientais, quanto à manipulação desses alimentos (Porte e Maia, 2001).

Diferentes fatores bióticos e abióticos podem interferir na distribuição e abundância de nematódeos ainda no campo e influenciar a sua ocorrência nos alimentos. Fatores como qualidade do solo e da água de irrigação, sistema de produção, tipo de adubação, temperatura, umidade e associações com outros seres vivos estão diretamente relacionados com o desenvolvimento e sobrevivência dos nematódeos no meio ambiente (Ritzinger et al., 2010; Ferraz e Brown, 2016). Outros fatores nos demais setores da cadeia produtiva como manejo, higienização e armazenamento dos produtos podem favorecer ou não a permanência desses micro-organismos nos produtos.

A variabilidade na frequência de nematódeos intra-amostras pode indicar que essa contaminação não apresenta distribuição homogênea na matriz, o que reforça a importância das replicatas para um resultado analítico mais representativo. O mesmo ocorre com outros alimentos, como os grãos, cujas contaminações por artrópodes como ácaros e insetos também não apresentam distribuição uniforme, devido à dinâmica do ecossistema dos locais de armazenamento (Sinha, 1991). Para contaminação microbiana em vegetais, segundo Maistro (2001), a quantidade de solo aderida à superfície do produto determina o início da contaminação, sendo assim é possível

supor que o mesmo ocorre com as contaminações por nematódeos, já que igualmente são organismos veiculados pelo solo ou água. A presença de solo agregado a determinadas folhas aliado à presença de umidade provavelmente são os fatores determinantes para a concentração de nematódeos em pontos específicos do produto.

Nas amostras higienizadas, as contaminações por nematódeos, vivos e mortos, e por outras matérias estranhas como insetos, ácaros e rotíferos demonstra que há falhas nos procedimentos de limpeza e desinfecção desses alimentos, que possuem indicação para seu consumo cru, sem nenhum tratamento adicional. A sobrevivência dos nematódeos nessas amostras indica que havia um microclima propício para o seu estabelecimento, com condições de temperatura e umidade adequadas e, provavelmente, com a presença de fungos ou bactérias. A colonização por micro-organismos deteriorantes e patogênicos é favorecida nesse tipo de produto, devido as injúrias físicas, como cortes e lesões nos tecidos vegetais, durante a higienização (Porte e Maia, 2001).

Para um melhor controle sanitário desses produtos as diversas etapas do fluxo de produção devem ser inspecionadas de forma a detectar os pontos críticos de contaminações. A lavagem, por meio de ação mecânica dos jatos de água, é o procedimento inicial para a retirada do solo aderido à superfície das folhas e contribui para a redução da flora microbiana nos vegetais e, provavelmente, dos demais tipos de contaminações por micro-organismos. A reutilização de água de lavagem, por exemplo, é um fator que pode promover e ampliar as contaminações, portanto é importante manter um rigoroso controle de qualidade da água (Maistro, 2001).

A presença de nematódeos vivos nos produtos indica falhas na desinfecção, possivelmente devido a utilização da solução sanitizante em concentrações inadequadas. Durante o processo de higienização é necessário o monitoramento da concentração dessa solução, uma vez que produtos utilizados para esse fim, como o cloro, podem volatilizar tornando o procedimento ineficiente. O enxague posterior à desinfecção necessita ser

realizado com água limpa, e a centrifugação para a retirada do excesso de água deve ser suficiente para a retirada e o desprendimento de todas as matérias estranhas.

O predomínio de nematódeos de vida livre do presente estudo, em sua maioria de formas bacteriófagas e micófagas, sem associação com formas evolutivas de parasitas, foi observado também por Pacífico et al. (2013) em 85% das amostras de alface crespa originárias de feiras livres do Rio de Janeiro. A ocorrência desses nematódeos é favorecida pelo ambiente utilizado para o cultivo de hortaliças, úmido e rico em matéria orgânica, que contribui para o desenvolvimento de micro-organismos saprófitas como bactérias e fungos. Os nematódeos de vida livre agrupam a maioria dos espécimes existentes no solo, em ambientes aquáticos ou marinhos. É o grupo mais heterogêneo, cuja característica comum é o fato de se alimentarem de organismos microscópicos como bactérias e fungos (Ritzinger, 2010; Ferraz e Brown, 2016).

Em virtude dos seus hábitos alimentares, não se pode subestimar o potencial dos nematódeos de vida livre atuarem como reservatórios ou vetores de patógenos no meio ambiente, como têm sido observados por diversos autores. Caldwell et al. (2003) evidenciaram um comportamento de atração do nematódeo *Caenorhabditis elegans* por diferentes cepas de *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, e verificaram a sobrevivência e reprodução do verme nessas colônias. Os autores também constataram que *C. elegans* incubados em cultura com *Salmonella*, quando depositados no solo, foram capazes de contaminar a superfície de frutas, sugerindo que nematódeos de vida livre podem auxiliar na dispersão de patógenos humanos presentes no solo para as superfícies de frutas e vegetais crus. Kenney et al. (2005), em estudo experimental, para determinar a persistência de *Escherichia coli* O157: H7 e salmonelas no intestino de *C. elegans*, demonstraram que após incubação nessas colônias houve ingestão e permanência desses patógenos no intestino de *C. elegans*, assim como transmissão à progênie, após duas gerações livres da exposição ao patógeno, e também a outros *C. elegans* do tipo selvagem não

infectados, possivelmente por meio da excreção de micro-organismos viáveis no ambiente.

Da mesma forma, os nematódeos podem ser potenciais vetores mecânicos para o transporte de protozoários, como evidenciou Huamanchay et al. (2004) em estudo experimental controlado com oocistos de *Cryptosporidium parvum* e *Cyclospora cayetanensis*. Neste estudo, cerca de 75 a 85% de vermes adultos de *C. elegans* ingeriram até 500 oocistos de *C. parvum* após 1 a 2 horas de incubação e os excretaram no ambiente, e além disso, vermes contendo oocistos no trato gastrointestinal mantidos em água foram infectantes para camundongos, demonstrando que *C. elegans* pode abrigar oocistos de *C. parvum* e transportá-los para pequenas distâncias em quantidade suficiente para contaminar produtos e infectar hospedeiros suscetíveis. Oocistos de *C. cayetanensis* não foram ingeridos por *C. elegans*, os autores sugerem que isso ocorreu, possivelmente, devido ao seu maior tamanho em relação ao *C. parvum*.

Essa evidência é preocupante por se tratar de um protozoário associado a surtos de doenças de transmissão alimentar e hídrica, capaz de sobreviver por longos períodos no meio ambiente, e cujos oocistos apresentam alta resistência a desinfetantes (Ryan et al., 2018). As implicações decorrentes das interações entre nematódeos de vida livre e bactérias ou protozoários patógenos e a sua persistência nos produtos alimentícios precisam ser melhor estudadas, entretanto, em vista dos dados apresentados, a presença de nematódeos de vida livre nos alimentos pode representar um risco indireto à saúde, especialmente aos produtos considerados prontos para o consumo, como as alfaces higienizadas.

Dentre os nematódeos detectados foi identificado um fitonematoide, pertencente ao gênero *Helicotylenchus* spp., que reúne diversas espécies espiraladas, entre elas umas poucas de interesse econômico, que podem atuar facultativamente como ectoparasitas ou endoparasitas (Ferraz e Brown, 2016). O fato das amostras serem compostas somente de folhas colaborou para esse resultado, pois os principais gêneros fitoparasitas de alface, como *Meloidogyne* spp. e *Rotylenchulus* spp., responsáveis por

perdas significativas na produtividade, são endoparasitas de raízes (Pinheiro, 2017).

No presente estudo não se evidenciou entre os exemplares isolados estágios larvares correspondentes aos nematódeos padrões, embora algumas larvas rabditoides tenham sido consideradas, a princípio, sugestivas de pertencerem aos gêneros *Strongyloides* e ancilostomídeos, por apresentarem características morfológicas gerais semelhantes a esses grupos como tipo de esôfago, presença de vestíbulo bucal, cauda afilada, primórdio genital aparente, entre outras (Figuras 39 a 43). Porém, após exame comparativo detalhado, as mesmas apresentaram particularidades morfológicas como estreitamento sutil da extremidade anterior, presença de papilas cefálicas sobressalentes, formato e localização do primórdio genital, cauda demasiadamente alongada, entre outras características que permitiram que essas hipóteses fossem rejeitadas. Três larvas sugestivas de ancilostomídeos com percentual de similaridade superior a 80% foram desconsideradas por não apresentarem todos os parâmetros necessários para a confirmação. A análise morfométrica permitiu diferenciar espécimes com semelhança morfológica que geraram dúvidas na identificação, e essa avaliação mais detalhada foi possível em virtude dos registros fotográficos dos padrões e dos exemplares isolados.

Contudo, a literatura demonstra a ocorrência de nematódeos zoonóticos nos estudos parasitológicos com amostras de alface em diversas regiões do Brasil. Neres et al. (2011) isolaram, entre outros enteroparasitas, larvas rabditoides de *S. stercoralis* e de ancilostomídeos e larvas filarioides de ancilostomídeos em amostras de alface crespa comercializadas em Anápolis (GO), assim como Soares e Cantos (2006) em Florianópolis (SC), Silva et al. (2016) na Bahia e Esteves e Figuerôa (2009) em Pernambuco, que isolaram larvas de *S. stercoralis*. Também em Pernambuco, Rocha et al. (2008) detectaram larvas de *Strongyloides* spp. em 100% das amostras de alface comercializadas em feira livre e Terto et al. (2014) encontraram 30% de positividade para nematódeos, com um caso de *Strongyloides* spp.

Entretanto, os achados do presente estudo em conjunto com as afirmações de Little (1966), Teixeira (1997), Vieira (2006) e Miné (2009) demonstram a dificuldade, ou até mesmo, a impossibilidade de determinação específica do gênero *Strongyloides* por meio de análise morfológica, portanto trabalhos que identificam espécies de *Strongyloides* em amostras ambientais precisam ser ponderados. Nestes casos, seria mais prudente e confiável realizar o diagnóstico em nível de gênero, como fez Rocha et al. (2008) e Terto et al. (2014), ainda que permaneça a dúvida se há importância médica no achado.

A análise morfológica de estágios larvais de nematódeos é relativamente complexa e um tanto subjetiva, pois depende diretamente do conhecimento e experiência do analista para o diagnóstico, portanto o treinamento do microscopista é uma questão fundamental para a correta identificação. Em amostras ambientais, a presença de larvas de nematódeos de vida livre, em alguns casos muito semelhantes morfológicamente às larvas parasitas, favorece a ocorrência de identificações enganosas.

A avaliação da similaridade proposta no estudo pode ser um recurso que auxilie na identificação e no diagnóstico diferencial de larvas originárias de amostras ambientais, desde que sejam coletados dados dos principais parâmetros determinados, pois foram verificadas semelhanças morfométricas entre as larvas padrões e larvas de vida livre, principalmente em relação ao CTC, CE e LC. Recursos microscópicos e fotográficos de alta qualidade também contribuem para uma identificação mais precisa.

Portanto, ressalta-se que dada à alta diversidade de espécies de nematódeos existentes no solo, a adoção de critérios precisos de identificação em relação aos caracteres morfológicos e morfométricos das larvas de nematódeos isoladas de alimentos é determinante para o diagnóstico diferencial dos espécimes, com um minucioso exame microscópico da extremidade anterior, esôfago e extremidade posterior, principalmente, que em conjunto apresentam características morfológicas e morfométricas específicas.

Outros fatores podem justificar as divergências entre os resultados do presente estudo, com ausência de formas larvais de nematódeos parasitas, e a ocorrência dessas formas nos demais estudos brasileiros, como condições sanitárias das regiões produtoras, sistemas de produção e tipos de hortaliça.

O cultivo de hortaliças é geralmente realizado em propriedades localizadas nas proximidades dos grandes centros urbanos, nos chamados cinturões verdes, e a qualidade da água de irrigação e do solo nos locais de plantio são fatores que determinam a produção de um alimento seguro e livre de contaminantes biológicos (Figueiredo, 2015). A ocorrência de contaminações em hortaliças de diferentes regiões do Brasil como Bahia, Pernambuco, Goiás entre outras, podem estar relacionadas à produção em áreas sem saneamento básico adequado. Ao longo dos últimos anos, embora o Brasil tenha obtido avanços em relação ao saneamento e ampliação da rede de abastecimento de água, onde 83,5% da população tem acesso à rede de tratamento de água, apenas 46% é atendida por serviços de coleta e tratamento de esgoto, e mais de 100 milhões de brasileiros descartam seus esgotos *in natura* no ambiente, contribuindo para a disseminação de doenças relativas ao saneamento ambiental inadequado (DRSAI) como algumas helmintoses (Oliveira et al., 2020).

O presente estudo não teve por objetivo avaliar a origem das amostras analisadas, porém algumas delas continham essa informação na embalagem, citando principalmente as cidades de Ibiúna, Biritiba Mirim e Salesópolis, localizadas próximas ao município de São Paulo. O estado de São Paulo possui o maior setor produtivo e o principal mercado consumidor de hortaliças do Brasil, sendo as regiões de Mogi das Cruzes e Sorocaba as grandes produtoras de verduras e legumes, principalmente repolho e alface (Camargo et al., 2008; Figueiredo, 2015). É também um dos estados que mais investem em saneamento, concentrando as 10 cidades com os melhores índices do país, sendo a cidade de São Paulo o município que mais investiu em saneamento nos últimos 5 anos, segundo o ranking do saneamento 2020 divulgado pelo Instituto Trata Brasil (Oliveira et al., 2020).

Em vista destes dados, e dos resultados do presente estudo, presume-se que as regiões de procedência das amostras analisadas apresentem adequada qualidade do solo e de água de irrigação em relação à contaminação fecal.

É possível que os diferentes sistemas de produção interfiram na ocorrência de contaminações biológicas das hortaliças, porém há poucos e controversos estudos a esse respeito. Gregório et al. (2012) verificaram maior contaminação parasitária nas alfaces crespas de cultivo tradicional do que nas hidropônicas, ao passo que Pacífico et al. (2013) observaram que a frequência de positividade para formas evolutivas de helmintos ou protozoários de importância médico-veterinária foi similar nas amostras de cultivos tradicional e hidropônico. Gomes Neto et al. (2012) verificaram piores condições higiênico sanitárias em amostras de cultivo tradicional e orgânico em relação as hidropônicas do tipo americana, com altos níveis de contaminação por parasitos intestinais principalmente nas amostras orgânicas. No entanto, Pinto-Ferreira et al. (2020), em estudo comparativo com amostras de alfaces de cultivo tradicional, orgânico e hidropônico, identificaram, por análise molecular, a presença de *T. gondii* em apenas uma amostra de alface hidropônica.

Existem diversos sistemas de produção de alface no Brasil, entre eles o cultivo convencional ou tradicional, o sistema orgânico em campo aberto, o cultivo protegido no sistema hidropônico e no solo (Henz e Suinaga, 2009). As produções tradicionais e orgânicas envolvem o contato das hortaliças diretamente no solo, podendo favorecer a ocorrência de parasitos de origem fecal no caso de solo contaminado por esgotos ou fezes animais (Ferreira et al., 2018). Nas produções orgânicas, o risco de contaminações pode ser ainda maior, devido ao uso de biofertilizantes ou adubos orgânicos, pois é proibido o uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos (Almeida et al., 2013; Brasil, 2003). Já no cultivo hidropônico, o risco de contaminações de origem fecal pode ser menor, uma vez que as hortaliças são cultivadas sem a presença do solo, por uma técnica que utiliza uma solução aquosa com nutrientes e fertilizantes químicos para o

desenvolvimento do cultivo (Silva et al., 2005), entretanto, a qualidade da água utilizada é imprescindível para a prevenção de contaminações das hortaliças, em todos os sistemas de produção (Chaidez et al., 2005; Ferreira et al., 2018).

Pode haver também alguma associação entre a ocorrência de contaminações e o tipo de hortaliça, em virtude da anatomia do vegetal influenciar ou não a aderência de formas parasitárias, porém há poucos estudos nesse sentido. Traviezo-Valles et al. (2004), na Venezuela, avaliando a ocorrência de enteroparasitos em amostras de alface americana e romana detectaram maior percentual de contaminação parasitária na alface do tipo americana, principalmente por larvas rabditoides e filarioides de *S. stercoralis* e *ancilostomídeos*, porém com menor diversidade de espécies contaminantes. Segundo os autores, essa diferença pode ter relação com o fato das folhas de alface americana possuírem maior contato com o solo em relação à romana e não, necessariamente, com a anatomia dos dois cultivares.

O fato das amostras de alface, *in natura* ou higienizadas, apresentarem nematódeos vivos indica que esse é um alimento que apresenta um microambiente favorável para a sobrevivência desses micro-organismos e confirma a importância da vigilância desses produtos para a adequada aplicação da legislação sanitária RDC nº 14/2014 (Brasil, 2014) e adequada avaliação do potencial de risco à saúde que esses alimentos representam.

Nos produtos *in natura* o consumidor tem a responsabilidade de realizar a higienização prévia ao seu consumo, tendo a oportunidade de retirar as sujidades e os possíveis contaminantes presentes, quando realizada da forma recomendada, em água corrente e com sanitizantes adequados à desinfecção, como o hipoclorito de sódio. Já as hortaliças higienizadas, comercializadas prontas para o consumo cru, devem estar livres de quaisquer sujidades ou contaminações, de forma a evitar a transmissão de patógenos, pois deveriam ter sido submetidas aos processos

recomendados e regulamentados de lavagem, desinfecção, secagem e embalagem (São Paulo, 2009).

Segundo a RDC nº 14/2014, são matérias estranhas indicativas de riscos à saúde humana aquelas detectadas macroscopicamente e/ou microscopicamente, capazes de veicular agentes patogênicos para os alimentos e/ou de causar danos ao consumidor, abrangendo, entre outras matérias estranhas, os parasitos, helmintos e protozoários, em qualquer fase de desenvolvimento, associados a agravos a saúde humana (Brasil, 2014). Sendo assim, por não terem sido encontradas larvas de nematódeos patogênicos ou outras matérias estranhas consideradas de risco, as amostras de alface higienizadas que continham nematódeos são consideradas em desacordo com a legislação por falhas nas Boas Práticas e não por risco direto à saúde. Por outro lado, considerando a possibilidade dos nematódeos de vida livre atuarem como carreadores de micro-organismos patógenos, como bactérias e protozoários associados à doenças de transmissão alimentar, a presença de vermes ou formas larvares de nematódeos em alimentos, principalmente no caso de vegetais higienizados, pode caracterizar um risco indireto à saúde, mesmo que não se faça uma identificação precisa dessas formas evolutivas.

A metodologia proposta ampliou a capacidade de identificação de larvas de nematódeos em alimentos em relação a outros estudos já existentes, com a perspectiva de utilizá-la como técnica de triagem direcionada para posterior confirmação por outros métodos, como os bio moleculares, com o objetivo de aumentar a precisão do diagnóstico diferencial. Espera-se que a associação entre os diferentes processos possibilite o atendimento da legislação sanitária quanto à avaliação da presença de nematódeos associados a agravos a saúde humana nos alimentos.

7. Conclusão

A análise morfológica e morfométrica dos diferentes estágios larvares de nematódeos de importância médica permitiu uma comparação mais detalhada entre os espécimes.

Por meio do estudo de similaridade, verificou-se a possibilidade de diferenciação entre larvas de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*. Da mesma forma, larvas rabditoides L1 de *S. stercoralis* e de *S. venezuelensis* puderam ser diferenciadas quando adicionados parâmetros morfométricos relacionados ao vestíbulo bucal e ao primórdio genital.

A metodologia de detecção de larvas de nematódeos em alface se mostrou eficiente, porém com perdas e variações quanto ao número de exemplares recuperados, indicando um decréscimo na recuperação das larvas com o aumento do nível de contaminação.

Nas amostras de alfaces analisadas não foi detectada a presença de nematódeos de risco a saúde. Porém as *in natura* apresentaram alta frequência de nematódeos de vida livre, com ocorrência significativamente superior em relação às higienizadas.

O alto percentual de amostras higienizadas insatisfatórias pela presença de diversas matérias estranhas, entre elas de nematódeos mortos e vivos, indica Falhas nas Boas Práticas no processamento desses produtos, e um risco indireto à saúde do consumidor.

8. Referências Bibliográficas

- Abougrain AK, Nahaisi MH, Madi NS, Saied MM, Ghenghesh KS. Parasitological contamination in salad vegetables in Tripoli-Libya. Food Control. 2010; 21:760–762. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.11.005>
- Adedayo O; Nasiiro R. Intestinal Parasitoses. J Natl Med Assoc. 2004; 96(1):93. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2594750/>
- Adenusi AA, Abimbola WA, Adewoga TO. Human intestinal helminth contamination in pre-washed, fresh vegetables for sale in major markets in Ogun State, southwest Nigeria. Food Control. 2015; 50:843-849. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.033>
- Almeida AJ, Lima VS, Rodrigues ABF, Filippo PA. Contamination with *Cryptosporidium* spp. in manure used as fertilizer in urban gardens. Rev. port. ciênc. vet. 2013; 108(585–586):23–27. Disponível em: <https://www.cdn.ciorganicos.com.br/wp-content/uploads/2014/07/234711176-Contaminacao-por-Cryptosporidium-spp-em-esterco-utilizado-como-adubo-pdf.pdf>
- 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 Trop. 2017; 169:187-201. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.014>
- Anderson RC, Chabaud AG, Willmott S. Keys to the nematode parasites of vertebrates. Archival Volume. Wallingford: CAB International; 2009.
- Andrassy I. A taxonomic review of the Suborder Rhabditina (Nematoda: Secernentia). Paris: Editions Orstom; 1983.
- Ash LR. Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). J Parasitol. 1970; 56(2):249-253. <https://doi.org/10.2307/3277651>
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, 24 dez. 2003. Seção 1, n. 250, p.8-9.
- Brasil. Ministério da Saúde. RDC ANVISA nº 14, de 28 de março de 2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, 31 mar. 2014. Seção 1, n.61, p.58-61.

Balarak D, Ebrahimi M, Modrek MJ, Bazrafshan E, Mahvi AH, Mahdavi Y. Investigation of parasitic contaminations of vegetables sold in markets in the city of Tabriz in 2014. Glob J Health Sci. 2016; 8(10):178-184. <http://dx.doi.org/10.5539/gjhs.v8n10p178>

Bender AL, Maurer RL, Silva MCFD, Ben R, Terraciano PB, Silva ACAD, Graeff-Teixeira C. Ovos e órgãos reprodutores de fêmeas de *Angiostrongylus costaricensis* são reconhecidos mais intensamente por soros humanos de fase aguda na angiostrongilíase abdominal. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36(4):449-454. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000400003>

Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. The lancet. 2006; 367(9521):1521-1532. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68653-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68653-4)

Burrows RB. Comparative morphology of *Ancylostoma tubaeforme* (Zeder, 1800) and *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859). J Parasitol. 1962; 48(5):715-718. <https://www.jstor.org/stable/3275261>

Caldwell KN, Anderson GL, Williams PL, Beuchat LR. Attraction of a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*, to foodborne pathogenic bacteria and its potential as a vector of *Salmonella* Poona for preharvest contamination of cantaloupe. J Food Prot. 2003; 66(11):1964-1971. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.11.1964>

Camargo A, Camargo F, Camargo Filho WP. Distribuição geográfica da produção de hortaliças no estado de São Paulo: participação no país, concentração regional e evolução no período 1996-2006. Inf. Econ. 2008; 38:28-35. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/ftp/iea/ie/2008/tec3-0108.pdf>

Cimernan B, Cimernan S. Parasitologia Humana. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2001.

Chaidez C, Soto M, Gortares P, Mena K. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in irrigation water and its impact on the fresh produce industry. Int J Environ Health Res. 2005; 15(5),339–345. <https://doi.org/10.1080/09603120500289010>

Corrêa LL, Silva MIPG, Silva RM, Dias RMDS. *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*: diagnóstico diferencial das larvas infestantes e prevalência em amostras fecais provenientes da grande São Paulo. Rev Inst Adolfo Lutz. 1979; 39(2):145-153. Disponível em: <https://doi.org/10.53393/rial.1979.v39.37150>

Centro de Vigilância Sanitária (CVS). Programas e Projetos - Programa Paulista de Alimentos. [Acesso em 15 set 2020]. Disponível em: http://www.cvs.saude.sp.gov.br/prog_det.asp?te_codigo=1&pr_codigo=6

Cognato BB, Morassutti AL, da Silva AA, Graeff-Teixeira C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, southern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2013; 46: 664-665. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0073-2013>

Cunha GM, Moraes LRS, Lima AGD, Matto PSMS, Frediani DA. Prevalência da infecção por enteroparasitas e sua relação com as condições socioeconômicas e ambientais em comunidades extrativistas do município de Cairu – Bahia. REEC, Rev. Eletrônica Eng. Civ. 2013;7(2). <https://doi.org/10.5216/reec.v7i2.27445>

Cowie RH. *Angiostrongylus cantonensis*: agent of a sometimes fatal globally emerging infectious disease (rat lungworm disease). ACS Chem. Neurosci. 2017; 8(10):2102–2104. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.7b00335>

De Ley P, Blaxter M. A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. Nematology Monographs and Perspectives. 2004; 2:633-653. https://doi.org/10.1163/9789004475236_061

De Ley P. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny [Internet]. WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology. WormBook; 2006. [Acesso em 09 fev 2020]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19684/>

De Paula FM, Gryscek RCB, Chieffi PP. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection in immunocompromised patients: problems and perspectives. Arq. Méd. Hosp. Fac. Ciênc. Méd. St. Casa São Paulo (Impr.). 2019; 64(2):157-159. <https://doi.org/10.26432/1809-3019.2019.64.2.157>

Dumidae A, Janthu P, Subkrasae C, Dekumyoy P, Thanwisai A, Vitta A. Genetic characterization of *Angiostrongylus* larvae and their intermediate host, *Achatina fulica*, in Thailand. PloS one. 2019; 14(9):e0223257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223257>

Espírito-Santo M CCD, Pinto PLS, Mota DJGD, Gryscek RCB. The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2013;55(2):129-132. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000200012>

Esteves FAM, Figueirôa EDO. Detecção de enteroparasitas em hortaliças comercializadas em feiras livres do município de Caruaru (PE). Rev. baiana saúde pública. 2009;33(2):184-193. <https://doi.org/10.22278/2318-2660.2009.v33.n2.a204>

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 (MRA) Nº 23. Rome, 2014. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112672/9789241564700_eng.pdf;sequence=1

FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. Fruit and vegetables for health initiative. 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i6807e.pdf>

Ferraz LCCB. Chave ilustrada de identificação dos principais gêneros de fitonematoides no Brasil baseada em caracteres das fêmeas. In: Diagnose de Fitonematoides. Campinas: Millennium Editora; 2016. p. 237-253.

Ferraz LCCB. Nematoides. In: Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres; 2018. p. 168-201. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/324391159>

Ferraz LCCB, Brown DJF. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus: Norma Editora; 2016. p. 251. Disponível em: <http://www.nematologia.com.br/files/livros/1.pdf>

Ferreira FP, Caldart ET, Freire RL, Mitsuka-Breganó R, Freitas FM, Miura AC, et al. The effect of water source and soil supplementation on parasite contamination in organic vegetable gardens. Braz. J. Vet. Parasitol. 2018;27(3):327-337. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180050>

Ferris H. The “Nematode-plant expert information system” [Internet]. A Virtual Encyclopedia on Soil and Plant Nematodes. Department of Entomology and Nematology. University of California, Davis, California. [Acesso em 03 ago 2020]. Disponível em: <http://nemaplex.ucdavis.edu>

Figueiredo GJB. Hortaliças: negócio do futuro ou do presente? Panorama das hortaliças no Brasil e no mundo. In: Revista Casa da Agricultura. Olericultura. Campinas: Cecor/CATI; 2015. Disponível em: https://www.cdrs.sp.gov.br/revistacasadaagricultura/22/RevistaCA_Olericultura_Ano18_n2.pdf

Gomes Neto NJ, Pessoa RML, Queiroga, IMBN, Magnani M, Freitas FIS, Souza EL, et al. Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. Food Control. 2012;28(1):47-51. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.033>

Gregório DS, Moraes GFA, Nassif JM, Alves MRM, Carmo NE, Jarrouge MG, Bouças RI, Santos ACC, Bouças TRJ. Estudo da contaminação por parasitas em hortaliças da região leste de São Paulo. Science in Health.

2012;3(2):96-103. Disponível em:
https://arquivos.cruzeirodosuleducacional.edu.br/principal/new/revista_scienc_einhealth/08_maio_ago_2012/science_02_2012.pdf#page=40

Guimarães AM, Alves EGL, Figueiredo HCP, Costa GMD, Rodrigues LDS. Frequência de enteroparasitas em amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em Lavras, Minas Gerais. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003;36(5):621-623. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000500014>

Harada YAOM e Mori O. A New Method for culturing Hook Worm. Yonago Acta Med. 1955;1(3):177-9.

Henz GP, Suinaga F. Tipos de alface cultivados no Brasil. Comunicado Técnico 75. Brasília (DF): Embrapa Hortaliças; 2009. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/783588/1/cot75.pdf>

Hotez PJ, Brooker S, Bethony JM, Bottazzi ME, Loukas A, Xiao S. Hookworminfection. N Engl J Med. 2004;351(8):799–807. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra032492>

Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. J Clin Invest. 2008;118(4):1311. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/34261/pdf>

Hotez PJ, Alvarado M, Basanez MG, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, et al. The Global Burden of Disease Study 2010: implications for the neglected tropical diseases. PLOS Negl Trop Dis. 2014;8(7):e2865. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865>

Huamanchay O, Genzlinger L, Iglesias M, Ortega YR. Ingestion of *Cryptosporidium* oocysts by *Caenorhabditis elegans*. J Parasitol. 2004;90(5):1176–1178. <https://doi.org/10.1645/GE-253R>

Joachim A, Dülmer N, Dauschies A. Differentiation of two *Oesophagostomum* spp. from pigs, *O. dentatum* and *O. quadrispinulatum*, by computer-assisted image analysis of fourth-stage larvae. Parasitology international. 1999;48(1):63-71. [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(99\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(99)00003-3)

Kenney SJ, Anderson GL, Williams PL, Millner PD, Beuchat LR. Persistence of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Newport, and *Salmonella* Poona in the gut of a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*, and transmission to progeny and uninfected nematodes. Int J Food Microbiol. 2005;101(2):227-236. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.043>

Kobayashi K. Morphological differences among mature larvae of *Necator americanus* and three other species of *Ankylostomidae*. Taiwan Igakkai

Zasshi = Journal of the Medical Association of Formosa. 1928;275:16-18.
Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19282902092>

Lass A, Szostakowska B, Myjak P, Korzeniewski K. Fresh fruits, vegetables and mushrooms as transmission vehicles for *Echinococcus multilocularis* in highly endemic areas of Poland: reply to concerns. Parasitol Res. 2016;115:3637–3642. doi:10.1007/s00436-016-5149-4

Leite ACR. Ancylostomatidae. In: Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 261-269.

Little MD. Comparative morphology of six species of Strongyloides (Nematoda) and redefinition of the genus. J Parasitol. 1966;52(1):69-84. doi:10.2307/3276396

Liu LX, Weller PF. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. Infect Dis Clin North Am. 1993; 7:655-682. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(20\)30548-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(20)30548-1)

Lok JB. *Strongyloides stercoralis*: a model for translational research on parasitic nematode biology [Internet]. WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology. WormBook, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19663/>

Luvira V, Watthanakulpanich D, Pittisuttithum P. Management of *Strongyloides stercoralis*: a puzzling parasite. International health. 2014;6(4):273-281. <https://doi.org/10.1093/inthealth/ihu058>

Luz JGG, Barbosa MV, de Carvalho AG, Resende SD, Dias JVL, Martins HR. Contaminação por parasitas intestinais em hortaliças comercializadas em uma área do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, Brasil. Rev. Nutr. 2017;30(1):127-136. <https://doi.org/10.1590/1678-98652017000100012>

Maistro LC. Alface minimamente processada: uma revisão. Rev. Nutr. 2001;14(3):219-224. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732001000300008>

Maldonade IR, Mattos LM, Moretti CL. Manual de boas práticas agrícolas na produção de alface. Documentos 142. Brasília (DF): Embrapa Hortaliças, 2014. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1009227/manual-de-boas-praticas-agricolas-na-producao-de-alface>

Maldonado Jr A, Simões RO, Oliveira APM, Motta EM, Fernandez MA, Pereira ZM, et al. First report of Angiostrongylus cantonensis (Nematoda: Metastrongylidae) in Achatina fulica (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105(7):938-41. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000700019>

Marouelli MA, Maldonade IR, Braga MB, Silva HR. Qualidade e segurança sanitária da água para fins de irrigação. Comunicado Técnico 134. Brasília (DF): Embrapa; 2014.

Matosinhos FC, Valenzuela VC, Silveira JA, Rabelo EM. Standardization of a method for the detection of helminth eggs and larvae in lettuce. *Parasitol. Res.* 2016;115(5):1827-1834. DOI 10.1007/s00436-016-4922-8

Miné JC. Caracterização de cepas de *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) Stiles & Hassal, 1902 (Rhabditida, Strongyloididae) isoladas de pacientes com e sem sintomatologia da região de Araraquara-SP. [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2009. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/104538>

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BR). Grupo de trabalho ICMS. Câmara setorial da cadeia produtiva de hortaliças. Instituto Brasileiro de Horticultura. Associação dos Produtores e Distribuidores de Hortifrúti do Estado de São Paulo; 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/hortalicas/2018/52a-ro/apresentacao-qt-icms.pdf>

Ministério da Saúde (BR) a. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Brasília (DF); 2010. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doe_ncas_alimentos.pdf

Ministério da Saúde (BR) b. Fundação Nacional de Saúde. Impactos na saúde e no sistema único de saúde decorrentes de agravos relacionados a um saneamento ambiental inadequado. Brasília (DF); 2010. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/impactos_saude_SUS_decorrentes_agravos_saneamento_ambiental_relatorio_final.pdf

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Informe 2018. Brasília (DF), 2019. Disponível em: <https://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>

Mogharbel ADI, Masson ML. Perigos associados ao consumo da alface (*Lactuca sativa*), in natura. *Alim. Nutr.* 2005;16(1):83-88.

Morassutti AL, Thiengo SC, Fernandez M, Sawanyawisuth K, Graeff-Teixeira C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(4):399-407. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140023>

Moss WW, Webster WA. Phenetics and numerical taxonomy applied to systematic nematology. J Nematol. 1970;2(1):16-25. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618715/pdf/16.pdf>

Mota DJG. Infecção natural por larvas de metastrongilídeos em moluscos terrestres de diferentes regiões do estado de São Paulo [Tese de doutorado]. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2018. Disponível em: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/08/1008307/dan-tese-final_.pdf

Mota DJG, Melo LCV, Pereira-Chiocola VL, Gava R, Pinto PLS. First record of natural infection by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) in *Belocaulus willibaldoi* and *Rattus norvegicus* in an urban area of São Paulo city, SP, Brazil. Heliyon. 2020;6(10),e05150. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05150>

Murphy GS, Johnson S. Clinical aspects of eosinophilic meningitis and meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the rat lungworm. Hawaii J. Med. Publ. Health. 2013;72(6,2):35–40. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3689484/>

Neafie RC, Marty AM. Unusual infections in humans. Clin Microbiol Rev. 1993;6(1):34-56. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.6.1.34>

Neres AC, Nascimento AH, Lemos KRM, Ribeiro EL, Leitão VO, Pacheco JBP, et al. Enteroparasitos em amostras de alface (*Lactuca sativa* var. *crispa*), no município de Anápolis, Goiás, Brasil. Biosci. J. 2011; 27(2). Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7613>

Nichols RL. The etiology of visceral larva migrans: II. Comparative larval morphology of *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* and *Ancylostoma caninum*. J Parasitol. 1956;42(4): 363-399. <https://doi.org/10.2307/3274519>

Oliveira AAB, Perez LF. Contaminação de enteroparasitas em folhas de alface (*Lactuca sativa*) e agrião (*Nasturtium officinalis*) em duas hortas comerciais de Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, Brasil. Revista Eletrônica Novo Enfoque. 2014;18:109-124.

Oliveira DM, Novaes BCB, Lucena VB, Souza TS, Barros NCL, Dias SS, et al. Perfil parasitológico do cheiro verde comercializado em feiras livres de Imperatriz-MA. Bio. Amaz. 2016;6(2):123-126. <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n2p123-126>

Oliveira CAF, Germano PML. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil, I - Pesquisa de helmintos. Rev Saude Publica. 1992;26(4):283-289. doi:10.1590/S0034-89101992000400011

Oliveira G, Scazufca P, Pires R. Ranking do saneamento Instituto Trata Brasil 2020 (SNIS 2018). São Paulo: GO Associados;2020. Disponível em:

http://www.tratabrasil.org.br/images/estudos/itb/ranking_2020/Relatorio_Ranking_Trata_Brasil_2020_Julho_.pdf

Oliveira JLDM, Cohen SC, Kligerman DC, Cardoso TADO, Assumpção RDSFV, Barrocas PRG. Os desafios do saneamento como promoção da saúde da população brasileira. (2020). Saúde debate. 2020;43(spe3):apresentação. <https://doi.org/10.1590/0103-11042019S300>

Organização Mundial de Saúde. Workshop de Lisboa sobre a promoção de hortofrutícolas nos países de expressão portuguesa. Lisboa; 2006. [Acesso em 25 nov 2019]. Disponível em: <https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/7593/1/Hortofruticolas.pdf>

Pacífico BB, Bastos OMP, Uchôa CMA. Contaminação parasitária em alfaces crespas (*Lactuca sativa* var. crispa), de cultivos tradicional e hidropônico, comercializadas em feiras livres do Rio de Janeiro (RJ). Rev Inst Adolfo Lutz. 2013;72(3):219-225. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2013/ses-30122/ses-30122-5467.pdf>

Pessoa SB. Parasitologia Médica. São Paulo: Editora Renascença; 1946. 10ª edição, 1981.

Pinheiro JB. Nematoides em hortaliças. Brasília (DF): Embrapa Hortaliças; 2017. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1070931/4/digitalizar0198.pdf>

Pinto-Ferreira F, Reis JB, Paschoal AT P, Balbino LS, Bertão-Santos A, Lucas JI et al. Molecular diagnosis of the curly lettuce parasitic contamination from hydroponic cultivation from supermarkets. Rev Bras Parasitol Vet. 2020;29(4)e015820. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020095>

Porte A, Maia LH. Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos. 2001;19(1). Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/viewFile/1227/1027>

Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker SJ. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. Parasit. vectors. 2014;7(1):37. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-37>

Quadros RM, Marques SMT, Favaro DA, Pessoa VB, Arruda AAR, Santini J. Parasitos em alfaces (*Lactuca sativa*) de mercados e feiras livres de Lages -

Santa Catarina. Revista Ciência & Saúde. 2008;1(2):78-84.
<https://doi.org/10.15448/1983-652X.2008.2.4368>

Ragazzi, MF. Estudo comparativo da qualidade parasitológica e toxicológica entre hortaliças cultivadas com água de reuso e hortaliças comercializadas em Ribeirão Preto-SP. [Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2012.

Rasch J, Krüger S, Fontvieille D, Ünal CM, Michel R, Labrosse A, Steinert M. Legionella-protozoa-nematode interactions in aquatic biofilms and influence of Mip on Caenorhabditis elegans colonization. Int J Med Microbiol. 2016;306(6):443-451. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.012>

Rey L. Um século de experiência no controle da ancilostomíase. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2001;34(1):61-67. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/mZ5LDvh4DGYFfxZPv7JPjsF/?lang=pt>

Ritzinger CHSP, Fancellil M, Ritzinger R. Nematoides: bioindicadores de sustentabilidade e mudanças edafoclimáticas. Rev. Bras. Frutic. 2010;32(4): 1289-1296. doi:10.1590/S0100-29452010000400045

Rocco SC. Infecção natural de nematódeos parasitas em *Achatina fulica* Ferussac (Gigante africano) (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora) relacionada com as condições sanitárias em vida livre e em criações comerciais no Estado de São Paulo. [Tese de doutorado]. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2007. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/sus-19498>

Rocha A, Mendes RA, Barbosa CS. *Strongyloides* spp. e outros parasitos encontrados em alfaces (*Lactuca sativa*). Rev. patol. trop. 2008;37(2):151-160. <https://doi.org/10.5216/rpt.v37i2.5046>

Roldán W, de Paula FM, Gryscek R. A simple method for purification of *Strongyloides venezuelensis* eggs from rat faeces. Journal of Helminthology. 2020; 94, E210. <https://doi.org/10.1017/S0022149X20000930>

Romero-Alegría A, Belhassen-García M, Velasco-Tirado V, Garcia-Mingo A, Alvela-Suárez L, Pardo-Lledias J, Sánchez MC. *Angiostrongylus costaricensis*: systematic review of case reports. Adv Infect Dis. 2014;4:36-41. DOI:10.4236/aid.2014.41007

Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes – Modificação do Método de Baermann. Rev Inst Adolfo Lutz. 1954;14(1):5-8.

Ryan U, Hijjawi N, Xiao L. Foodborne cryptosporidiosis. Int J Parasitol. 2018;48(1):1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.09.004>

Said DES. Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. Alexandria Journal of Medicine. 2012;48(4):345-352. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2012.05.005>

São Paulo (Estado). Secretaria da Agricultura e Abastecimento. Resolução SAA nº 42, de 19 de junho de 2009. Norma Técnica para produtos hortifrutícolas minimamente processados e frescos cortados. Diário Oficial do Estado. São Paulo/ SP. Seção I: 119 (114).

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M, Roy SL, et al. Foodborne Illness Acquired in the United States – Major Pathogens. Emerg Infect Dis. 2011;17(1). doi: 10.3201/eid1701.P11101

Schar F, Trostorf U, Giardina F, Khieu V, Muth S, Marti H, et al. Strongyloides stercoralis: global distribution and risk factors. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2288. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002288>

Shahnazi M, Jafari-Sabet M. Prevalence of parasitic contamination of raw vegetables in villages of Qazvin Province, Iran. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(9):1025-30. doi:10.1089=fpd.2009.0477

Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of Strongyloides stercoralis infection. Clin. infect. dis. 2001; 33(7):1040-1047. <https://doi.org/10.1086/322707>

Silva AS, Silva IMM, Rebouças LT, Almeida JS, Rocha EVS, Amor ALM. Análise parasitológica e microbiológica de hortaliças comercializadas no município de Santo Antônio de Jesus, Bahia (Brasil). Vigil. Sanit. Debate. 2016;4(3):77-85. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.00655>

Silva LGB, Silva LMB, Arrais FMA, Melanda GCS, Ferreira RJ. Prevalência de estruturas parasitárias de protozoários e de helmintos em hortaliças comercializadas em barracas de rua no município de Crato–CE, Brasil. Revista Saúde (Santa Maria). 2018;44(3). Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/revistasauade/article/view/29982>

Silva TC, Rodrigues TP, de Carvalho PD, Oliveira TB, Campos DMB. Encontro de *Rhabditis* sp em alface *Lactuca sativa* comercializada em Anápolis, Goiás, Brasil. Rev. patol. trop. 2013;42(2). DOI: <https://doi.org/10.5216/rpt.v42i2.25528>

Silva DF, Michelon N, Orsini F, Tromboni F, Gianquinto GP. Manual prático de horticultura hidropônica para cultivar hortaliças em área urbana e periurbana. Universidade de Pádua (Itália) e Fundação Padre Antonio Dante Cíviero (Teresina, PI). 2005; 1-34. [Acesso em 10 mar 2020]. Disponível em: <https://aquaponiabrasil.files.wordpress.com/2015/09/manual-prc3a1tico-de-horticultura-hidropc3b4nica-para-cultivar-de-hortic3a7as-em-c3a1rea-urbana-e-periurbana-funaci-piauc3ad-ano-2005-c3a1-2007.pdf>

Sinha RN. Storage Ecosystems. *In: Ecology and management of food-industry pests*. Virginia: Association of Official Analytical Chemists; 1991. p.17-30.

Soares B, Cantos GA. Detecção de estruturas parasitárias em hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, SC, Brasil. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2006; 42(3):455-460. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.014>

Song L, Wang X, Yang Z, Lv Z, Wu Z. *Angiostrongylus cantonensis* in the vector snails *Pomacea canaliculata* and *Achatina fulica* in China: a meta-analysis. *Parasitol res.* 2016; 115(3):913-923. DOI 10.1007/s00436-015-4849-5

Spratt DM. Species of *Angiostrongylus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in wildlife: a review. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2015; 4(2):178-89. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.02.006>

Sudré AP, Macedo HW, Peralta RHS, Peralta JM. Diagnóstico da estrongiloidíase humana: importância e técnicas. *Rev. patol. trop.* 2006; 35(3):173-184. DOI: <https://doi.org/10.5216/rpt.v35i3.1876>

Teixeira ATLS. *Strongyloides stercoralis*: frequência em exames parasitológicos do Hospital de Clínicas da UNICAMP e análise morfométrica das larvas. *Rev Soc Bras de Med Trop.* 1997; 30(1): 75-76. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821997000100016>

Terto WDS, Oliveira RG, Lima MM. Avaliação parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa* L.) comercializadas em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. *Vigil. Sanit. Debate.* 2014; 2(3):51-57. DOI:10.3395/vd.v2i3.220

Thiengo SC, Maldonado A, Mota EM, Torres EJL, Caldeira R, Carvalho ODS, et al. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. *Acta Trop.* 2010; 115:194-199. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.005>

Thiengo SC, Faraco FA, Salgado NC, Cowie RH, Fernandez MA. Rapid spread of an invasive snail in South America: the giant African snail, *Achatina fulica*, in Brasil. *Biol Invasions.* 2007; 9(6):693-702. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10530-006-9069-6>

Tobar J, Sarmiento DR, Tayupanta D, Rodríguez M, Aguilar F. Microscopic and molecular evaluation of *Strongyloides venezuelensis* in an experimental life cycle using Wistar rats. *Biomédica.* 2021; 41(2). <https://doi.org/10.7705/biomedica.5650>

Traviezo-Valles L, Dávila J, Rodríguez R, Perdomo O, Pérez J. Contaminación enteroparasitaria de lechugas expandidas en mercados del

estado Lara. Venezuela. Parasitol Latinoam. 2004; 59:167-170. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122004000300014>

US Department of Agriculture (USDA). Lettuce, raw. [Acesso em 30 out 2020]. Disponível em: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/1103358/nutrientes>

Valente R, Robles MDR, Navone GT, Diaz JI. Angiostrongylus spp. in the Americas: geographical and chronological distribution of definitive hosts versus disease reports. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2018; 113(3):143-152. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170226>

Van Wyk JA, Cabaret J, Michael LM. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. Vet Parasitol. 2004; 119(4):277-306. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.012>

Vieira FM, Lima SS, Bessa ECA. Morfologia e biometria de ovos e larvas de *Strongyloides* sp. Grassi, 1879 (Rhabditoidea: Strongyloididae) parasito gastrointestinal de *Hydrochaeris hydrochaeris* (Linnaeus, 1766)(Rodentia: Hydrochaeridae), no Município de Juiz de Fora, Minas Gerais. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2006;15(1):7-12. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/3978/397841457002.pdf>

Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR. Human angiostrongyliasis. Lancet Infect Dis. 2008; 8(10):621-630. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70229-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70229-9)

World Health Organization. Soil-transmitted helminth infections. [Acesso em 10 abril 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infection>

Yoshida Y. Comparative Studies on Ancylostoma braziliense and Ancylostoma ceylanicum. II. The Infective Larval Stage. J Parasitol. 1971; 57(5):990-992. <https://doi.org/10.2307/3277852>

Zhong-Xing W, Yi-Xin Q. Differentiating the morphology of infective larvae between two human hookworms. Zhongguo xue xi chong bing fang zhi za zhi= Chinese journal of schistosomiasis control. 2018; 30(3):359-360. DOI: 10.16250/j.32.1374.2018138

Ziech AR, Conceição PC, Luchese AV, Paulus D, Ziech MF. Cultivo de alface em diferentes manejos de cobertura do solo e fontes de adubação. Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient. 2014; 18(9):948-954. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n09p948-954>

9. Anexos

Anexo 1 - Dados brutos dos parâmetros morfométricos de larvas padrões rabditoides de *S. stercoralis*

	CTC	CE	LC	DPGC	DAC	LC/CTC	CE/CTC	CVB	LEA	CBV/LEA	CPG	LPG	CPG/LPG
L1	259,54	78,40	14,98	108,70	46,09	0,06	0,30	4,72	9,47	0,50	16,6	4,72	3,52
L2	269,50	86,07	15,16	113,04	42,31	0,06	0,32	3,63	7,49	0,48	18,21	4,75	3,83
L3	272,07	81,78	15,28	106,42	45,88	0,06	0,30	4,98	9,33	0,53	16,77	4,51	3,72
L4	255,12	78,81	14,72	107,50		0,06	0,31						
L5	265,43	79,13	13,81	103,88	39,88	0,05	0,30				20,73	5,07	4,09
L6	253,10	74,60	15,39	104,58	45,19	0,06	0,29	2,91	8,61	0,34	16,62	5,26	3,16
L7	249,41	79,30	14,57	96,53	37,65	0,06	0,32	2,89	7,78	0,37	12,97	5,1	2,54
L8	289,51	80,87	13,61			0,05	0,28	3,47	8,95	0,39			
L9	236,77	73,90	14,18	88,96		0,06	0,31				19,58	6,07	3,23
L10	241,81	75,17	14,63	99,10		0,06	0,31	2,73	8,34	0,33	14,59	5,15	2,83
L11	273,61	84,79	15,73	109,35	43,11	0,06	0,31	3,82	8,53	0,45	17,63	4,35	4,05
L12	243,59	83,50	15,31	96,73		0,06	0,34	3,59	8,28	0,43	17,3	4,06	4,26
L13	246,26	79,18	14,75	111,72		0,06	0,32						
L14	253,48	77,54	15,12	93,96		0,06	0,31						
L15	263,17	79,46	14,52	105,20		0,06	0,30	3,42	8,1	0,42	18,33	5,03	3,64
L16	299,92	84,35	14,85	123,17	47,84	0,05	0,28	4,92	8,3	0,59	18,75	4,99	3,76
L17	266,41	84,79	15,07	108,99		0,06	0,32	3,12	9,57	0,33	16,5	4,65	3,55
L18	261,81	70,91					0,27						
L22	273,83	74,33	17,01	121,85	46,95	0,06	0,27	2,8	7,36	0,38	11,84	3,55	3,34
L23	251,38												

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; CVB: comprimento do vestibulo bucal; LEA: largura da extremidade anterior; CPG: comprimento do primórdio genital e LPG: largura do primórdio genital

Anexo 2 - Dados brutos dos parâmetros morfométricos de larvas padrões filarioides de *S. stercoralis*

	CTC	CE	LC	DPGC	DAC	LC/CTC	CE/CTC	LEA
L1	449,90	123,83	12,96	204,84		0,03	0,28	7,09
L2	479,18	169,84	12,73			0,03	0,35	6,22
L3	483,73	211,09	12,37	169,43		0,03	0,44	8,64
L4	425,68	176,83	11,01	150,65		0,03	0,42	6,81
L5	458,34	193,22	12,70	161,61	44,07	0,03	0,42	6,92
L6	450,78	192,76	13,01	150,89		0,03	0,43	8,03
L7								6,02
L8	456,07	166,69	12,70	156,81	57,97	0,03	0,37	6,76
L9	430,00	172,23	12,06			0,03	0,40	7,29
L10								
L11	442,32	180,02	11,68	148,35		0,03	0,41	6,96
L12	447,93							7,09
L13	461,81	163,84	12,38	159,09		0,03	0,35	7,49
L14	458,69	176,83	11,01	150,65		0,02	0,39	6,85
L15	451,87	192,47	12,82			0,03	0,43	9,12
L16	436,69				54,19			6,65
L17	433,97				57,91			6,19
L18								
L19	460,00							7,51
L20	471,32	179,19	12,24			0,03	0,38	8,49
L21	436,85			158,32	56,75			6,52
L22	453,25							6,71
L23								
L24	465,05	196,76	14,24	172,98	58,72	0,03	0,42	6,64
L25	444,57			162,18				6,86
L26	464,96	159,81	12,06			0,03	0,34	7,22
L27	456,44	175,50	12,52	170,12	61,83	0,03	0,38	7,19
L28	456,54	167,98	13,88	164,92	64,05	0,03	0,37	7,72
L29	450,93	174,46	12,30	162,35	58,72	0,03	0,39	7,57
L30	471,76	174,47	12,06	167,91	55,87	0,03	0,37	7,09
L31	458,60	201,97	12,55	161,78	60,72	0,03	0,44	7,00
L32	463,04							6,82
L33	467,32	181,88	12,17	154,56		0,03	0,39	7,46

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; LEA: largura da extremidade anterior

Anexo 3 - Dados brutos dos parâmetros morfométricos de larvas padrões rabditoides (L1) de *S. venezuelensis*

	CTC	CE	LC	DAC	DPGC	LC/CTC	CE/CTC	CVB	LEA	CVB/LEA	CPG	LPG	CPG/LPG
L1	229,02	80,47	13,68	34,01	91,48	0,06	0,35	5,10	6,94	0,73	12,15	3,49	3,48
L2	245,25	81,73	14,58	33,82		0,06	0,33	6,07	8,04	0,75			
L3	216,70	73,09	13,08			0,06	0,34	5,77	6,85	0,84			
L4	242,53	79,07	14,68	32,44		0,06	0,33	4,87	7,27	0,67			
L5	260,18	79,74	14,64		113,54	0,06	0,31	4,65	6,94	0,67	5,65	2,22	2,55
L6	223,60	75,66	12,99			0,06	0,34	5,18	6,88	0,75			
L7		71,57	12,70					5,27	7,39	0,71	7,81	2,51	3,11
L8	238,90	76,50	14,60		95,94	0,06	0,32	4,47	6,97	0,64	9,27	2,38	3,89
L9	240,04	77,27	12,88		103,08	0,05	0,32	3,93	6,7	0,59	11	2,12	5,19
L10	265,67	83,84	14,94		117,98	0,06	0,32				7,97	2,53	3,15
L11	258,28	86,14	13,57		112,73	0,05	0,33	4,56	7,02	0,65	11,63	3,03	3,84
L12	226,53	75,72	12,39	30,31		0,05	0,33	3,17	6,26	0,51			
L13	240,11	75,77	11,05			0,05	0,32						
L14	201,22	69,24	11,37			0,06	0,34	3,69	5,93	0,62			
L15	214,96	74,32	11,27			0,05	0,35	3,1	6,42	0,48			
L16	202,68	69,42	11,49	29,20		0,06	0,34	3,89	6,2	0,63			
L17	225,30	74,29	11,30	32,62		0,05	0,33	3,86	6,23	0,62			
L18	222,81	72,69	12,28			0,06	0,33	3,62	5,9	0,61			
L19	203,45	68,08	10,99			0,05	0,33	3,48	7	0,50			
L20	203,84	70,31	13,70			0,07	0,34	4,2	5,87	0,72			
L21	222,27	76,32	13,04			0,06	0,34	3,27	6,11	0,54			
L22	219,51	78,53	12,25			0,06	0,36	4,25	5,91	0,72			
L23	224,04	74,26	12,17	34,12		0,05	0,33	3,29	6,23	0,53	11,03	2,96	3,73
L24	219,05	72,13	12,03	36,3	90,16	0,05	0,33	3,33	6,32	0,53	10,86	3,22	3,37
L25	225,07	72,23	12,39	37,84		0,06	0,32	4,29	6,52	0,66			
L26	219,9	76,82	12,09		89,7	0,05	0,35	3,95	6,23	0,63	10,09	2,97	3,40
L27	218,3	73,79	11,57	34,57		0,05	0,34	3,34	6,57	0,51			
L28	222,49	76,49	12		91,9	0,05	0,34	3,87	6,83	0,57	12,42	2,87	4,33
L29	224,71	75,08	15,88		95,1	0,07	0,33	3,92	6,86	0,57	15,88	3,36	4,73
L30	210,82	72,39	11,39		87,46	0,05	0,34	2,95	6,29	0,47	12,36	3,11	3,97

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; CVB: comprimento do vestíbulo bucal; LEA: largura da extremidade anterior; CPG: comprimento do primórdio genital e LPG: largura do primórdio genital

Anexo 4 - Dados brutos dos parâmetros morfométricos de larvas padrões rabditoides (L2) de *S. venezuelensis*

	CTC	CE	LC	DAC	DPGC	LC/CTC	CE/CTC	CVB	LEA	CVB/LEA	CPG	LPG	CPG/LPG
L1	536,84	100,13	17,43	72,20	254,25	0,03	0,19	4,93	7,45	0,66	18,52	4,42	4,19
L2	496,95	96,51	16,78		225,60	0,03	0,19	5,69	6,83	0,83	21,76	4,55	4,78
L3	489,90	95,88	17,62	57,70	213,43	0,04	0,20	3,88	6,63	0,59	19,45	6,74	2,89
L4	474,23	96,21	17,61	65,53	212,45	0,04	0,20				15,1	3,15	4,79
L5	517,35	103,20	19,63	56,63	264,54	0,04	0,20	4,21	6,95	0,61		4,08	0,00
L6	511,12	108,03	19,25	66,85	225,21	0,04	0,21	3,61	6,71	0,54	22,45	8,12	2,76
L7	479,62	96,35	18,04	65,92	223,61	0,04	0,20	3,48	7,17	0,49	13,42	3,9	3,44
L8	455,98	93,91	17,86	59,18	210,94	0,04	0,21		6,2	0,00	18,13	3,21	5,65
L9	498,07	98,88	17,71	67,77	224,96	0,04	0,20	3,50	7,01	0,50	17,06	3,75	4,55
L10	475,22	94,04	17,46	60,53	212,79	0,04	0,20	3,67	8,04	0,46	14,43	3,96	3,64
L11	460,99	95,99	18,42	61,77	211,62	0,04	0,21	4,24	7,47	0,57	15,28	4,48	3,41
L12	514,48	102,90	20,36	67,41	233,72	0,04	0,20	4,71	7,17	0,66			
L13	490,83	96,37	17,37	70,41	225,93	0,04	0,20	4,52	7,27	0,62	15,54	3,96	3,92
L14	442,49	91,22	16,84	61,65	201,70	0,04	0,21	4,28	6,41	0,67	15,04	3,63	4,14
L15	483,16	100,55	18,24	58,39	172,04	0,04	0,21	3,41	7,02	0,49		3,31	0,00
L16	523,82	100,38	21,03	61,17	239,12	0,04	0,19	4,42	7,97	0,55		4,55	0,00
L17	536,12	109,77	21,26	66,63	258,18	0,04	0,20	3,88	7,84	0,49	19,07	4,36	4,37
L18	553,17	108,60	20,71	70,38	252,24	0,04	0,20	5,24	7,49	0,70	18,27	3,68	4,96
L19	504,43	102,22	18,55	58,00	233,68	0,04	0,20	3,97	6,85	0,58	12,11	2,28	5,31
L20	576,91	120,48	20,98	77,23	263,12	0,04	0,21	5,84	8,03	0,73	17,8	2,12	8,40
L21	513,44	100,75	19,26	67,78	235,65	0,04	0,20	3,59	7,3	0,49	14,59		
L22	523,72	96,59	21,12	65,65	243,56	0,04	0,18	4,33	7,88	0,55	12,7	2,9	4,38
L23	463,33	90,01	17,74	59,93	211,21	0,04	0,19				11,85	3,1	3,82
L24	533,94	99,58	18,13	61,09	235,02	0,03	0,19		7,49	0,00	20,84	4,82	4,32
L25	551,77	112,46	23,26	63,36	258,22	0,04	0,20	5,11	8,66	0,59	18,68	3,76	4,97
L26	511,08	110,41	23,77	65,57	234,52	0,05	0,22	4,37	7,66	0,57	17,97	3,15	5,70
L27	506,36	97,86	19,32	60,70	231,32	0,04	0,19	6,30	8,66	0,73	14,54	2,88	5,05
L28	539,45	105,32	20,81	68,79	249,42	0,04	0,20	5,25	7,15	0,73	18,45	3,62	5,10
L29	508,98	101,44	18,09	77,35	236,64	0,04	0,20	4,78	7,65	0,62	17,01	3,12	5,45
L30	480,75	97,20	19,18	61,90	220,48	0,04	0,20	5,28	7,23	0,73			
L31	511,51	94,90	18,04	66,59	237,78	0,04	0,19	5,20	7,56	0,69	13,75	3,62	3,80
L32	473,51	92,19	16,85	55,10	204,37	0,04	0,19	5,35	6,58	0,81	24,29	5,48	4,43

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; CVB: comprimento do vestíbulo bucal; LEA: largura da extremidade anterior; CPG: comprimento do primórdio genital e LPG: largura do primórdio genital

Anexo 5 - Dados brutos dos parâmetros morfométricos de larvas padrões filarioides de *S. venezuelensis*

	CTC	CE	LC	DAC	LC/CTC	CE/CTC	LEA
L1	514,48	195,78	14,48		0,03	0,38	5,54
L2	494,86	180,87	15,93	53,07	0,03	0,37	6,35
L3	532,43	194,66	15,87		0,03	0,37	6,04
L4	456,76	171,22	14,79	51,12	0,03	0,37	6,82
L5	528,35	175,51	14,48		0,03	0,33	6,10
L6	498,59	162,09	17,89		0,04	0,33	5,86
L7	514,88	189,98	13,37		0,03	0,37	5,83
L8	474,33	169,66	15,23		0,03	0,36	5,75
L9	519,41	183,53	16,32		0,03	0,35	5,42
L10	457,54	175,98	13,11		0,03	0,38	5,43
L11	515,27	185,27	14,94		0,03	0,36	5,68
L12	530,26	192,44	17,37		0,03	0,36	5,35
L13	513,75	180,05	18,35		0,04	0,35	5,95
L14	518,31	192,33	15,57		0,03	0,37	5,82
L15	456,37	163,53	14,51	56,61	0,03	0,36	6,15
L16	544,97	196,69	14,68		0,03	0,36	6,34
L17	444,54	162,06	16,41		0,04	0,36	6,06
L18	532,08	174,21	15,48	60,47	0,03	0,33	7,08
L19	504,28	183,99	15,11	60,60	0,03	0,36	5,25
L20	522,71	182,86	17,31		0,03	0,35	5,74
L21	547,78	171,40	15,76		0,03	0,31	6,17
L22	542,77	196,44	12,95		0,02	0,36	6,13
L23	470,73	191,12	15,22		0,03	0,41	6,46
L24	500,64	179,72	17,39	65,09	0,03	0,36	6,43
L25	506,15	187,66	14,59	62,80	0,03	0,37	5,84
L26	433,21	168,36	17,48		0,04	0,39	5,63
L27	503,45	176,01	16,72		0,03	0,35	5,55
L28	475,58	164,11	16,99	59,65	0,04	0,35	6,57
L29	514,18	194,05	16,78		0,03	0,38	6,10
L30	497,80	172,56	19,26		0,04	0,35	5,70
L31	506,21	191,92	15,88	66,67	0,03	0,38	6,47
L32	463,65	160,87	13,44		0,03	0,35	5,65
L33	532,28	184,39	16,93	40,89	0,03	0,35	6,26
L34	515,72	186,32	16,53	56,66	0,03	0,36	5,93
L35	491,40	179,22	17,57	51,77	0,04	0,36	5,43

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DAC: distância do ânus a cauda; LEA: largura da extremidade anterior

Anexo 6 - Estudo da similaridade entre larvas rabditoides (L1) de *S. stercoralis* e (L1) de *S. venezuelensis*

	CTC	CE	LC	DPGC	DAC	CVB	LEA	CPG	LPG
L1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
L2	0	1	1	1	0	1	1	0	0
L3	0	1	1	1	0	1	0	0	0
L4	1	1	1	1					
L5	1	1	1	1	0			0	0
L6	1	1	1	1	0	0	0	0	0
L7	1	1	1	1	1	0	1	1	0
L8	0	1	1			1	0		
L9	1	1	1	1				0	0
L10	1	1	1	1		0	0	1	0
L11	0	1	1	1	0	1	0	0	0
L12	1	1	1	1		1	0	0	0
L13	1	1	1	1					
L14	1	1	1	1					
L15	1	1	1	1		1	0	0	0
L16	0	1	1	1	0	1	0	0	0
L17	0	1	1	1		1	0	0	0
L18	1	1							
L22	0	1	0	0	0	0	1	1	0
L23	1								

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; CVB: comprimento do vestíbulo bucal; LEA: largura da extremidade anterior; CPG: comprimento do primórdio genital e LPG: largura do primórdio genital

Anexo 7 - Estudo da similaridade entre larvas filarioides de *S. stercoralis* e de *S. venezuelensis*

	CTC	CE	LC	DAC	LEA
L1	1	0	1		0
L2	1	1	1		1
L3	1	0	1		0
L4	0	1	0		1
L5	1	1	1	1	1
L6	1	1	1		0
L7					1
L8	1	1	1	1	1
L9	0	1	1		0
L10					
L11	1	1	0		1
L12	1				0
L13	1	1	1		0
L14	1	1	0		1
L15	1	1	1		0
L16	1			1	1
L17	1			1	1
L18					
L19	1				0
L20	1	1	1		0
L21	1			1	1
L22	1				1
L23					
L24	1	1	1	1	1
L25	1				1
L26	1	0	1		0
L27	1	1	1	1	0
L28	1	1	1	1	0
L29	1	1	1	1	0
L30	1	1	1	1	0
L31	1	0	1	1	1
L32	1				1
L33	1	1	1		0

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DAC: distância do ânus a cauda

Anexo 8 - Dados brutos dos parâmetros morfométricos de larvas padrões rabditoides de ancilostomídeos

	CTC	CE	LC	DAC	DPGC	LC/CTC	CE/CTC	CVB	LEA	CPG	LPG	CVB/LEA	CPG/LPG
L1	641,92	124,90	25,33	91,40		0,04	0,19	15,92	13,08			1,22	
L2	605,07	131,67	24,47	88,85		0,04	0,22						
L3	548,70	123,70	22,93	92,59		0,04	0,23	16,95	13,62			1,24	
L4	647,23	129,45	24,08	91,28		0,04	0,20	17	14,77			1,15	
L5	657,84	124,48	25,24	99,93	283,02	0,04	0,19	17,76	13,53	10,52	2,68	1,31	3,93
L6	642,08	132,63	25,20			0,04	0,21	16,31	14,67			1,11	
L7	669,61	124,39	24,52	105,47		0,04	0,19	16,19	13,83			1,17	
L8	695,78	120,06	22,34	100,19		0,03	0,17	14,7	12,7			1,16	
L9	618,23	127,16	24,84	101,09		0,04	0,21	18,06	15,42			1,17	
L10	629,02	129,38	25,23	75,76	253,05	0,04	0,21	14,37	12,87			1,12	
L11	628,90	128,57	24,45			0,04	0,20	15,46	13,32			1,16	
L12	663,13	124,48	24,53	98,82		0,04	0,19						
L13	632,61	118,59	22,09	96,15		0,03	0,19	14,59	12,06			1,21	
L14	633,12	129,30	22,32			0,04	0,20						
L15	614,67	130,72	24,81	93,81	257,61	0,04	0,21	17,07	14,3	11,03	2,75	1,19	4,01
L16	649,21	130,89	26,39	100,23		0,04	0,20	16,7	15,63			1,07	
L17	625,34	132,21	27,76			0,04	0,21	16,38	14,09			1,16	
L18	607,02		26,72	98,50		0,04							
L19	589,18	116,75	23,72			0,04	0,20	13,06	10,2			1,28	
L20	610,65	122,00	24,61	91,33	257,87	0,04	0,20			8,82	3,62		2,44
L21	582,26	125,16	25,00			0,04	0,21	16,66	14,73			1,13	
L22	588,39	126,58	28,53	65,95		0,05	0,22	16,18	12,03			1,34	
L23	616,65		27,70	88,52		0,04		15,65	13,85			1,13	
L24	619,96	137,23	29,89			0,05	0,22	16,71	15,87			1,05	
L25	621,84	129,51	27,61			0,04	0,21	16,12	15,03			1,07	
L26		124,55	25,33										
L27	598,53	122,85	23,39			0,04	0,21	13,65	14,23			0,96	
L28	619,34	127,20	24,98			0,04	0,21	15,46	14,08			1,10	
L29	590,63	135,55	25,00			0,04	0,23	17,92	14,09			1,27	
L30	634,84	134,84	23,28	94,84		0,04	0,21	17,33	14,11			1,23	
L31	636,40	127,33	20,66	100,58		0,03	0,20						
L32	597,55	121,67	22,00			0,04	0,20						
L33	516,72	114,31	22,82			0,04	0,22						
L34	601,44	124,78	29,03			0,05	0,21						
L35	438,98	99,14	23,71			0,05	0,23	10,18	9,78			1,04	
L36	328,00	87,99	17,67			0,05	0,27						
L37		80,24	16,03					10,34	9,02			1,15	
L38	592,07												
L39	586,81	147,43	19,89	68,79		0,03	0,25						
L40	542,86	116,46	23,38			0,04	0,21	14,23	12,1			1,18	

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda; CVB: comprimento do vestibulo bucal; LEA: largura da extremidade anterior; CPG: comprimento do primórdio genital e LPG: largura do primórdio genital

Anexo 9 - Dados brutos dos parâmetros morfométricos de larvas padrões
 filarioides de *ancilostomídeos*

	CTC	CE	LC	DAC	CTM	LM	LC/CTC	CE/CTC	LEA
L1	561,80	135,78	18,98		639,37	23,60	0,03	0,24	9,65
L2	529,85	127,41	16,10		603,71	25,02	0,03	0,24	9,85
L3	586,90	133,33	19,06		646,68	23,73	0,03	0,23	9,99
L4	529,05	127,29	16,58		592,40	23,42	0,03	0,24	10,74
L5	510,83	121,54	18,29		577,35	23,77	0,04	0,24	10,15
L6	480,76	114,17	17,12		534,43	22,86	0,04	0,24	9,76
L7	564,73	125,86	17,44		621,18	23,25	0,03	0,22	
L8	550,29	127,13	19,29		616,41	24,67	0,04	0,23	9,44
L9	539,80	138,24	20,54		612,81	25,15	0,04	0,26	9,17
L10	517,98		11,02		581,30	14,78	0,02		10,3
L11	537,93	139,07	18,00		594,43	22,91	0,03	0,26	6,5
L12	520,12	127,19	18,74		584,54	26,74	0,04	0,24	10,04
L13	551,90	131,34	17,47		649,15	26,11	0,03	0,24	9,85
L14	569,94	103,69	15,96		615,41	19,35	0,03	0,18	12,17
L15	550,19	111,55	13,51		617,39	18,40	0,02	0,20	9,79
L16	539,37	123,86	17,18		618,02	23,37	0,03	0,23	9,6
L17	497,43	120,20	16,64		585,83	25,00	0,03	0,24	11,58
L18	558,35	122,06	16,77		630,30	26,07	0,03	0,22	11,25
L19	519,35	124,05	18,97		579,01	24,17	0,04	0,24	9,55
L20	542,25	127,30	17,53		620,81	24,43	0,03	0,23	9,49
L21	564,79	128,48	16,40		659,59	22,60	0,03	0,23	9,53
L22	504,75	124,46	16,79		575,37	23,65	0,03	0,25	11,98
L23	488,38	128,44	18,98		549,43	24,15	0,04	0,26	9,76
L24	511,39	122,75	16,88		583,11	24,85	0,03	0,24	11,32
L25	546,05	130,34	19,84		627,56	25,97	0,04	0,24	12,49
L26	539,28	130,10	17,99		617,21	25,16	0,03	0,24	9,53
L27	550,48	133,49	19,67		619,55	24,97	0,04	0,24	10,87
L28	543,52	128,43	18,66		650,58	25,75	0,03	0,24	10,55
L29	522,52	125,30	17,22		603,24	24,43	0,03	0,24	10,43
L30	551,39	127,17	17,65		634,63	24,87	0,03	0,23	12,3
L31	540,60	120,82	19,25		659,66	22,38	0,04	0,22	12,47
L32	654,17	152,43	24,01			32,74	0,04	0,23	15,54
L33	628,50	157,48	24,69			32,01	0,04	0,25	13,98
L34	644,23	150,68	26,27			34,12	0,04		16,96
L35	632,65	155,78	25,83			32,19	0,04	0,25	14,82
L36	641,67	150,99	28,64			33,94	0,04	0,24	15,53
L37			24,90			33,85			15,81
L38	641,29	149,65	25,06			30,91	0,04	0,23	17,18
L39	628,03	153,35	24,73			32,03	0,04	0,24	14,13
L40	633,48	159,94	24,82			31,25	0,04	0,25	12,65
L41	610,76	152,93	24,23			32,38	0,04	0,25	13,59
L42	635,74	154,58	25,31			32,52	0,04	0,24	
L43	600,69		26,80			34,18	0,04		
L44	632,20	148,05	26,20			31,34	0,04	0,23	
L45	658,25	151,82	23,95	80,32		31,00	0,04	0,23	
L46	643,50	149,74	26,50			34,19	0,04	0,23	
L47	628,60	155,66	25,60				0,04	0,25	
L48	624,76	154,83	21,10			26,37	0,03	0,25	

L49	639,65	155,32	21,25			28,81	0,03	0,24	
L50	630,32	160,06	20,72	76,41	666,85	26,52	0,03	0,25	
L51	640,27	158,28	20,23	72,70	696,76	26,23	0,03	0,25	
L52	608,65	149,04	22,18			26,19	0,04	0,24	
L53	618,88	158,12	21,46		669,32	26,55	0,03	0,26	
L54	641,90	161,98	20,80			24,41	0,03	0,25	
L55	624,51	166,41	20,55			27,34	0,03	0,27	
L56	626,82	160,25	20,67		667,50	27,31	0,03	0,26	
L57	611,01	152,30	21,83	80,21		25,73	0,04	0,25	
L58	618,97	156,84	21,25		670,40	25,25	0,03	0,25	
L59	569,29	154,69	20,26		611,14	26,36	0,04	0,27	
L60	643,71	158,33	21,60	80,21		25,87	0,03	0,25	
L61	635,12	153,36	20,19			25,5	0,03	0,24	
L62	620,50	159,21	21,01		658,32	26,92	0,03	0,26	
L63	616,26	150,04	20,78	60,80	638,54	25,10	0,03	0,24	14,35
L64	615,36	156,84	22,14	67,91	633,56	25,71	0,04	0,25	13,33
L65	604,92	154,26	20,19	72,42	628,52	25,06	0,03	0,26	14,24
L66	631,73	159,38	21,63	67,03	663,57	25,46	0,03	0,25	13
L67	585,23	149,10	20,62	66,71	617,00	25,70	0,04	0,25	14,42
L68	600,65	153,65	20,59	60,67	623,80	24,65	0,03	0,26	13,49
L69	652,76	156,15	20,87	74,52	694,39	24,66	0,03	0,24	14,73
L70	623,11	154,41	20,48	75,47	662,28		0,03	0,25	11,83
L71	632,44	149,13	21,01	71,57	669,94	23,89	0,03	0,24	13,13
L72	647,62	166,47	19,79	74,64	691,02	22,86	0,03	0,26	13,37
L73	635,03	149,87	19,37	72,50	672,88	24,73	0,03	0,24	
L74	640,36	157,25	21,19	67,02	665,36	25,46	0,03	0,25	
L75	620,90	148,56	25,15	71,39			0,04	0,24	
L76	615,64	154,24	21,10		667,08	27,47	0,03	0,25	
L77	616,55	152,51	22,81			28,29	0,04	0,25	
L78	662,34	156,21	23,35		706,83	30,68	0,04	0,24	
L79	685,59	157,71	20,75	76,07		28,75	0,03	0,23	
L80	621,63	150,52	20,55	75,98	653,31	26,50	0,03	0,24	
L81	631,53	149,74	18,99	74,84	671,07	25,17	0,03	0,24	
L82	643,32	157,94	21,00	76,48	671,69	27,30	0,03	0,25	
L83	630,49	151,72	20,55	76,40	662,19	28,62	0,03	0,24	
L84	631,29	156,98	20,35	73,40		26,03	0,03	0,25	
L85	646,26	158,65	20,70	77,31	675,81	27,44	0,03	0,25	
L86	630,48	153,89	21,56	75,98		27,44	0,03	0,24	
L87	642,06	153,65	19,95	79,64		26,14	0,03	0,24	
L88	669,11	164,24	20,65	73,09	702,61	24,47	0,03	0,25	
L89	620,65	151,97	21,18	76,56	649,15	25,30	0,03	0,24	
L90	588,51	145,62	21,25	73,63	611,00	25,54	0,04	0,25	
L91	617,44	153,26	23,51	76,28	648,27	29,60	0,04	0,25	
L92	633,36	151,37	24,77	76,59	669,79	31,37	0,04	0,24	
L93	590,24	151,09	21,72			28,52	0,04	0,26	
L94	612,29	159,24	26,58	70,98	638,19	32,08	0,04	0,26	
L95	609,71	157,04	21,02	74,85	636,61	28,55	0,03	0,26	
L96	645,59	158,73	21,75	79,60		27,84	0,03	0,25	
L97		151,55	20,3	71,94		27,09			
L98	673,70	166,55	26,70				0,04	0,25	12,8
L99	651,22	154,95	21,60				0,03	0,24	14,2
L100	635,87	160,16	21,36				0,03	0,25	14,18

L101	647,38	155,36	22,66	91,40		0,04	0,24	13,88
L102	637,79	157,38	20,71			0,03	0,25	13,31
L103	591,13	157,64	23,03	71,16		0,04	0,27	12,53
L104	619,15	159,03	23,26			0,04	0,26	11,55
L105	636,86	164,76	22,58			0,04	0,26	13,92
L106	644,37	147,82	24,29	75,22		0,04	0,23	11,78
L107	650,61	155,67	23,19			0,04	0,24	12,01
L108	676,37	160,91	25,37			0,04	0,24	
L109	618,33	155,39	26,23			0,04	0,25	
L110	634,03	152,28	21,73	90,54		0,03	0,24	
L111	625,25	152,97	20,39	80,47		0,03	0,24	
L112								
L113	652,98	156,91	24,31	86,97		0,04	0,24	
L114	660,05	165,43	22,72			0,03	0,25	
L115	638,12	153,99	22,56	85,00		0,04	0,24	
L116	622,47	148,21	21,86	82,69		0,04	0,24	
L117	651,13	161,00	23,17			0,04	0,25	
L118	580,23	143,39	21,65	84,17		0,04	0,25	
L119	668,71	163,80	23,87			0,04	0,24	
L120	648,47	167,85	24,07	91,12		0,04	0,26	
L121	642,66	156,01	19,98	84,96		0,03	0,24	
L122	643,22	150,66	22,69	88,59		0,04	0,23	
L123	658,38	158,64	23,53	65,24		0,04	0,24	
L124	633,68	156,49	18,74	87,70		0,03	0,25	
L125	628,36	154,11	22,75	86,35		0,04	0,25	
L126	662,73	157,09	23,31	92,78		0,04	0,24	
L127	649,55	160,58	21,14	87,87		0,03	0,25	
L128	626,12	159,23	20,84	89,52		0,03	0,25	
L129	624,16	154,39	21,33	69,90	647,89	0,03	0,25	12,8
L130	605,51	148,27	22,24	70,44		0,04	0,24	14,2
L131	593,66	150,60	19,66	72,80	610,11	0,03	0,25	14,18
L132	595,67	147,36	21,72	70,48	637,58	0,04	0,25	13,88
L133	584,20	148,59	22,35	82,10	624,09	0,04	0,25	13,31
L134	577,05	149,89	17,96		609,23	0,03	0,26	12,53
L135	637,62	156,40	19,83	74,63		0,03	0,25	11,55
L136	607,03	149,31	19,62	72,34	619,37	0,03	0,25	13,92
L137	637,39	155,88	21,51	66,16	650,33	0,03	0,24	11,78
L138	587,36	150,59	21,07	56,86	620,37	0,04	0,26	12,01
L139	580,16	136,39	20,80	55,83		0,04	0,24	
L140	582,66	145,85	21,28		615,10	0,04	0,25	
L141	598,55	146,60	21,10	73,49	633,21	0,04	0,24	
L142	608,80	151,01	21,54	75,85		0,04	0,25	
L143	619,33	150,30	23,32	75,69		0,04	0,24	
L144	598,81	142,69	21,16	80,33		0,04	0,24	
L145	629,92	150,32	20,48	75,80		0,03	0,24	
L146	631,01	152,52	21,02	74,12		0,03	0,24	
L147	584,62	142,95	20,34	67,97		0,03	0,24	
L148	593,42	144,53	19,61	75,10		0,03	0,24	
L149	622,18	148,39	19,77	79,79		0,03	0,24	
L150	600,51	147,98	18,38			0,03	0,25	
L151	624,37	150,51	19,98	70,87		0,03	0,24	
L152	625,51	164,36	20,54	76,02		0,03	0,26	

L153	609,93	148,48	15,99		0,03	0,24
L154	597,13	145,85	17,93		0,03	0,24
L155	629,27	148,01	20,89	78,89	0,03	0,24
L156	606,77	148,20	21,17	84,88	0,03	0,24
L157	611,15	152,97	21,13	77,06	0,03	0,25
L158	627,09	152,7	21,85	85,63	0,03	0,24
L159	629,91	156,48	21,49	82,15	0,03	0,25

CTC: comprimento total do corpo; CE: comprimento do esôfago; LC: largura do corpo; DAC: distância do ânus a cauda; CTM: comprimento total da muda; LM: largura da muda; LEA: largura da extremidade anterior

Anexo 10 - Dados brutos dos parâmetros morfométricos de larvas padrões L1
de *A. cantonensis*

	CTC	LC	CE	DAC	LC/CTC	CE/CTC
L1	276,77	12,69	101,33	15,40	276,77	12,69
L2	282,42	13,81	136,12	16,14	141,21	6,91
L3	276,67	13,11	130,73	24,05	92,22	4,37
L4	287,68	13,39	135,22	20,56	71,92	3,35
L5	253,56	12,56	126,65	16,94	50,71	2,51
L6	270,20	11,58	135,49	14,86	45,03	1,93
L7	274,96	11,85	132,97	19,76	39,28	1,69
L8	277,06	11,90	135,19	25,07	34,63	1,49
L9	248,42	11,18	124,92	17,34	27,60	1,24
L10	244,60	11,08	121,94	16,77	24,46	1,11
L11	291,35	12,41	134,25	25,19	26,49	1,13
L12	263,33	12,61	128,33	23,49	21,94	1,05
L13	253,21	11,38	129,27	18,30	19,48	0,88
L14	281,63	12,60	128,10	18,02	20,12	0,90
L15	243,91	11,53	120,94	17,19	16,26	0,77
L16	277,53	12,16	133,97	24,51	17,35	0,76
L17	283,06	12,99	134,86	20,71	16,65	0,76
L18	264,44	11,53	125,91	18,59	14,69	0,64
L19	257,53	11,10	134,32	16,10	13,55	0,58
L20	257,81	11,37	128,34	16,80	12,89	0,57
L21	225,98	12,05	118,69	15,70	10,76	0,57
L22	261,34	11,92	127,58	23,47	11,88	0,54
L23	215,46	12,73	117,83	19,72	9,37	0,55
L24	252,56	12,39	126,64	21,48	10,52	0,52
L25	227,04	10,67	111,63	22,39	9,08	0,43
L26	262,92	11,12	127,03	23,23	10,11	0,43
L27	256,62	11,55	123,73	17,32	9,50	0,43
L28	267,94	11,12	134,85	25,01	9,57	0,40
L29	245,89	12,14	120,86	16,53	8,48	0,42
L30	274,84	11,59	130,98	19,70	9,16	0,39
L31	206,73	10,82	107,88	18,49	6,67	0,35
L32	263,60	12,53	133,38	17,07	8,24	0,39
L33	284,75	12,35	133,66	19,79	8,63	0,37
L34	243,94	11,19	121,02	21,13	7,17	0,33
L35	264,15	11,84	126,43	18,75	7,55	0,34

CTC: comprimento total do corpo; LC: largura do corpo; CE: comprimento do esôfago;
DAC: distância do ânus a cauda

Anexo 11 - Dados brutos dos parâmetros morfométricos de larvas padrões L3 de *A. cantonensis*

	CTC	LC	CE	DPE	DPGC	DAC	L/CTC	CE/CTC
L1	453,66	26,21		89,36	158,99	36,19	0,06	
L2	454,90	27,93	180,85	87,71	159,09	36,43	0,06	0,40
L3	447,25	24,28	162,17	88,23	152,85	34,68	0,05	0,36
L4	446,03	23,86	176,60	97,78	156,66	32,97	0,05	0,40
L5	443,40	24,00	171,22	87,21	154,34	34,26	0,05	0,39
L6	446,12	24,39	170,48	86,92	154,62	34,99	0,05	0,38
L7	456,59	26,39	170,32	88,10	165,08	39,34	0,06	0,37
L8	473,81	24,35	175,92	90,89	162,20	35,82	0,05	0,37
L9	455,59	26,17	169,67	89,66	163,50	33,66	0,06	0,37
L10	452,17	25,12	173,70	87,45	155,94	36,40	0,06	0,38
L11	450,13	23,79	171,61	81,11	159,90	31,96	0,05	0,38
L12	445,83	22,80	166,76	89,44	155,76	31,67	0,05	0,37
L13	464,88	32,99	182,68	88,90	160,67	35,38	0,07	0,39
L14	437,91	23,48	169,87	82,83	140,10	36,10	0,05	0,39
L15	463,94	23,36	167,04	91,83	155,15	36,15	0,05	0,36
L16	456,72	25,17	175,20	87,85	158,93	33,19	0,06	0,38
L17	442,56	23,67	177,24	87,28	152,32	33,88	0,05	0,40
L18	453,07	23,80	167,20	88,16	155,48	32,16	0,05	0,37
L19	452,14	24,16	170,82	89,39	159,23	34,76	0,05	0,38
L20	462,61	24,30	173,66	88,12	165,35	39,36	0,05	0,38
L21	470,54	23,22	170,66	86,79	162,96	33,00	0,05	0,36
L22	461,60	22,76	175,88	87,26	160,03	37,19	0,05	0,38
L23	448,08	23,89	175,09	90,01	151,31	35,70	0,05	0,39
L24	434,04	28,25	168,71	84,70	156,42	35,78	0,07	0,39
L25	476,63	30,49	179,83	92,89	174,52	46,92	0,06	0,38
L26	435,39	29,39	175,82	84,87	136,02	36,63	0,07	0,40
L27	454,57	28,22	175,12	82,11	157,90	34,15	0,06	0,39
L28	457,63	30,30	170,09	89,43	156,84	34,01	0,07	0,37
L29	454,41	24,75	175,68	89,27	164,05	35,14	0,05	0,39
L30	460,87	29,17	179,92	86,78	174,32	39,65	0,06	0,39
L31	449,81	28,23	176,41	87,71	154,63	34,49	0,06	0,39
L32	454,03	24,74	171,29	91,10	157,45	38,34	0,05	0,38
L33	457,69	26,81	181,36	88,77	165,66	38,09	0,06	0,40
L34	471,38	25,61	182,65	91,55	167,03	37,45	0,05	0,39
L35	482,66	24,12	179,08	88,11	161,21	31,36	0,05	0,37

CTC: comprimento total do corpo; LC: largura do corpo; CE: comprimento do esôfago; DAC: distância do ânus a cauda

Anexo 12 - Dados brutos dos parâmetros morfométricos de larvas padrões L1 de *A. costaricensis*

	CTC	LC	CE	DAC	LC/CTC	CE/CTC
L1	221,36	10,05	107,68	22,06	0,05	0,49
L2	218,90	10,42	107,39	22,70	0,05	0,49
L3	231,17	9,38	107,34	21,58	0,04	0,46
L4	211,05	10,07	102,53	19,72	0,05	0,49
L5	222,00	9,53	108,61	19,20	0,04	0,49
L6	207,16	10,03	100,09	19,11	0,05	0,48
L7	201,99	9,39	97,80	18,59	0,05	0,48
L8	221,63	9,71	108,20	20,23	0,04	0,49
L9	211,21	10,89	102,90	18,38	0,05	0,49
L10	216,63	9,91	105,99	22,11	0,05	0,49
L11	211,65	10,15	105,33	21,30	0,05	0,50
L12	225,76	10,52	108,25	22,40	0,05	0,48
L13	224,53	10,31	107,14	20,34	0,05	0,48
L14	223,79	10,74	103,52	23,12	0,05	0,46
L15	224,52	10,11	108,88	21,76	0,05	0,48
L16	219,88	10,19	107,37	19,71	0,05	0,49
L17	203,19	10,71	103,19		0,05	0,51
L18	218,93	10,41	104,08	21,92	0,05	0,48
L19	225,14	10,73	109,31	21,75	0,05	0,49
L20	216,76	10,93	104,22	19,47	0,05	0,48
L21	235,35	10,25	107,14	25,12	0,04	0,46
L22	224,54	9,70	109,91	22,55	0,04	0,49
L23	210,87	12,91	106,80	17,69	0,06	0,51
L24	222,24	9,83	110,39	20,68	0,04	0,50
L25	231,84	9,67	109,24	22,10	0,04	0,47
L26	243,96	10,10	112,98	25,11	0,04	0,46
L27	235,10	9,61	112,41	19,60	0,04	0,48
L28	222,80	10,52	109,77	21,73	0,05	0,49
L29	234,66	10,34	114,40	23,59	0,04	0,49
L30	213,45	10,15	112,94	18,73	0,05	0,53
L31	216,09	9,86	104,35	20,34	0,05	0,48
L32	227,29	10,34	111,99	22,84	0,05	0,49
L33	215,31	10,74	104,74	22,47	0,05	0,49
L34	218,12	9,89	110,47	19,16	0,05	0,51

CTC: comprimento total do corpo; LC: largura do corpo; CE: comprimento do esôfago; DAC: distância do ânus a cauda

Anexo 13 - Dados brutos dos parâmetros morfométricos de larvas padrões L3 de *A. costaricensis*

	CTC	LC	CE	DPE	DPGC	DAC	L/CTC	CE/CTC
L1	413,69	23,44	143,80	79,14	132,66	31,13	0,06	0,35
L2	462,03	26,37	153,49	90,00	153,78	30,16	0,06	0,33
L3	466,00	24,55	154,36	91,35	152,66	34,15	0,05	0,33
L4	466,45	26,48	155,40	87,94	166,39	28,91	0,06	0,33
L5	446,68	25,38	148,81	88,31	147,77	34,72	0,06	0,33
L6	464,79	22,45	159,82	88,47	148,85	36,03	0,05	0,34
L7	467,56	24,94	155,60	90,17	163,71	36,92	0,05	0,33
L8	471,39	25,81	154,54	89,29	156,45	33,49	0,05	0,33
L9	471,55	25,55	154,01	75,70	162,07	30,40	0,05	0,33
L10	467,41	24,36	150,34	88,48	158,63	31,03	0,05	0,32
L11	444,67	26,10	145,07	83,07	144,45	31,52	0,06	0,33
L12	463,92	25,37	152,19	90,67	148,96	33,62	0,05	0,33
L13	451,20	24,00	149,25	92,17	153,48	32,59	0,05	0,33
L14	460,84	24,73	152,37	87,29	157,35	35,88	0,05	0,33
L15	441,71	25,08	148,90	82,86	143,46	34,27	0,06	0,34
L16	480,77	26,65	159,08	86,61	161,53	30,27	0,06	0,33
L17		25,15	154,29	85,07	137,29	31,08		
L18	474,07	27,60	155,59	90,24	162,39	30,10	0,06	0,33
L19	476,31	24,39	154,70	95,31	156,56	30,99	0,05	0,32
L20	454,57	24,27	151,37	90,59	151,97	30,49	0,05	0,33
L21	483,41	25,37	160,17	91,22	164,16	28,44	0,05	0,33
L22	440,55	24,90	148,50	81,57	144,61	31,13	0,06	0,34
L23	438,70	25,21	148,47	81,86	138,60	22,29	0,06	0,34
L24	471,34	24,86	154,15	89,79	157,23	19,89	0,05	0,33
L25	439,73	26,15	150,97	88,84	144,94	29,47	0,06	0,34
L26	489,92	28,53	160,24	88,85		35,03	0,06	0,33
L27	466,97	24,64	152,45	87,45	162,98	33,51	0,05	0,33
L28	463,59	25,49	155,57	89,63	147,29	33,20	0,05	0,34
L29	452,05	23,71	151,27	91,77	151,38	31,96	0,05	0,33
L30	441,10	24,58	150,39	87,33	145,26	32,00	0,06	0,34
L31	449,12	23,12	156,16	87,02	147,87	34,22	0,05	0,35
L32	466,93	24,57	157,41	87,89	152,95	33,24	0,05	0,34

CTC: comprimento total do corpo; LC: largura do corpo; CE: comprimento do esôfago; DPE: distância do poro excretor; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda

Anexo 14 - Estudo da similaridade entre larvas (L1) de *A. cantonensis* e (L1) de *A. costaricensis*

	CTC	LC	CE	DAC
L1	0	1	1	0
L2	0	0	0	0
L3	0	0	0	1
L4	0	0	0	1
L5	0	1	0	0
L6	0	1	0	0
L7	0	1	0	1
L8	0	1	0	1
L9	0	1	0	1
L10	0	1	0	0
L11	0	1	0	1
L12	0	1	0	1
L13	0	1	0	1
L14	0	1	0	1
L15	1	1	0	1
L16	0	1	0	1
L17	0	1	0	1
L18	0	1	0	1
L19	0	1	0	0
L20	0	1	0	0
L21	1	1	0	0
L22	0	1	0	1
L23	1	1	0	1
L24	0	1	0	1
L25	1	1	1	1
L26	0	1	0	1
L27	0	1	0	1
L28	0	1	0	1
L29	0	1	0	0
L30	0	1	0	1
L31	1	1	1	1
L32	0	1	0	1
L33	0	1	0	1
L34	1	1	0	1
L35	0	1	0	1

CTC: comprimento total do corpo; LC: largura do corpo; CE: comprimento do esôfago; DAC: distância do ânus a cauda

Anexo 15 - Estudo da similaridade entre larvas (L3) de *A. cantonensis* e (L3) *A. costaricensis*

	CTC	LC	CE	DPE	DPGC	DAC
L1	1	1		1	1	1
L2	1	1	0	1	1	1
L3	1	1	0	1	1	1
L4	1	1	0	0	1	1
L5	1	1	0	1	1	1
L6	1	1	0	1	1	1
L7	1	1	0	1	1	0
L8	1	1	0	1	1	1
L9	1	1	0	1	1	1
L10	1	1	0	1	1	1
L11	1	1	0	1	1	1
L12	1	1	0	1	1	1
L13	1	0	0	1	1	1
L14	1	1	0	1	1	1
L15	1	1	0	1	1	1
L16	1	1	0	1	1	1
L17	1	1	0	1	1	1
L18	1	1	0	1	1	1
L19	1	1	0	1	1	1
L20	1	1	0	1	1	0
L21	1	1	0	1	1	1
L22	1	1	0	1	1	0
L23	1	1	0	1	1	1
L24	1	1	0	1	1	1
L25	1	0	0	1	0	0
L26	1	0	0	1	1	1
L27	1	1	0	1	1	1
L28	1	0	0	1	1	1
L29	1	1	0	1	1	1
L30	1	0	0	1	0	0
L31	1	1	0	1	1	1
L32	1	1	0	1	1	0
L33	1	1	0	1	1	0
L34	1	1	0	1	0	0
L35	1	1	0	1	1	1

CTC: comprimento total do corpo; LC: largura do corpo; CE: comprimento do esôfago; DPE: distância do poro excretor; DPGC: distância do primórdio genital a cauda; DAC: distância do ânus a cauda

Anexo 16 - Dados brutos da verificação da recuperação de nematódeos em amostras de alface, em diferentes níveis de contaminação e três replicatas (A, B e C)

	Replicatas		
	A	B	C
Nível 1 (10 larvas)	8	10	7
Nível 2 (25 larvas)	25	16	22
Nível 3 (50 larvas)	31	31	30

Anexo 17 - Dados brutos das análises de detecção de nematódeos em amostras de alface *in natura*

Nº Amostra	Região	Tipo de estabelecimento	Nematódeos isolados					Outras Matérias Estranhas
			A	B	C	Total	Vivos	
IN 1	Norte	Hortifruti	39	34	10	83	7	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmento de inseto, larva de inseto morta, rotífero morto, ácaro morto
IN 2	Norte	Quitanda	30	17	32	79	11	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmento de inseto, larva de inseto morta, rotífero vivo e morto, ácaro morto
IN 3	Sul	Supermercado Atacadista	5	2	2	9	2	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmento de inseto, larva de inseto morta, rotífero vivo e morto
IN 4	Oeste	Feira Livre	0	1	2	3	0	Fragmento de inseto, ácaro, rotífero vivo
IN 5	Oeste	Mercado	2	18	3	23	2	Inseto inteiro morto, fragmento de inseto, larva de inseto, rotíferos vivos
IN 6	Sul	Feira livre	3	0	2	5	0	Inseto inteiro morto, fragmento de inseto, ovo de inseto
IN 7	Oeste	Feira livre	0	2	1	3	0	Inseto inteiro morto, fragmento de inseto, ovo de inseto
IN 8	Norte	Feira Livre	13	3	14	30	2	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmento de inseto, rotíferos mortos, ácaro morto
IN 9	Sul	Supermercado	2	1	0	3	0	ovo de inseto, fragmento de inseto, larva de inseto morta, rotífero morto e vivo
IN 10	Leste	Sacolão	2	0	1	3	0	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmento de inseto, larva de inseto morta
IN 11	Sul	Mercado	0	0	1	1	0	larva de inseto, fragmento de inseto, ovo de inseto
IN 12	Norte	Mercado	5	3	20	28	7	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmento de inseto, larva de inseto, rotíferos vivos e mortos, ácaro morto,
IN 13	Sul	Hortifruti	3	8	5	16	4	Inseto inteiro morto, fragmento de inseto, larva de inseto, rotíferos vivos e mortos, ácaro morto,
IN 14	Norte	Feira Livre	174	46	58	278	7	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmento de inseto, larva de inseto, rotíferos vivos e mortos, ácaro morto,
IN 15	Centro	Feira Livre	54	78	15	147	16	Fragmentos de inseto, ovo de inseto, rotíferos vivos e mortos,
IN 16	Leste	Mini Mercado	6	0	0	6	3	Inseto inteiro morto (lepidóptera), fragmentos de inseto, ovo de inseto
IN 17	Sul	Feira livre	8	20	7	35	5	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmento de inseto, larva de inseto

IN 18	Sul	Feira Livre	0	5	1	6	1	Inseto inteiro morto, fragmento de inseto, larva de inseto, ovo de inseto, rotíferos vivos e mortos
IN 19	Leste	Supermercado	6	14	12	32	0	Inseto morto, rotífero morto
IN 20	Oeste	Ceagesp	2	2	2	6	2	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmento de inseto, larva de inseto morta, ácaro morto
IN 21	Leste	Sacolão	0	2	2	4	1	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmento de inseto, rotífero morto, ácaro morto
IN 22	Norte	Sacolão	3	5	3	11	0	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmento de inseto, larva de inseto morta, ácaro morto
IN 23	Leste	Hortifruti Mercado Municipal	1	1	0	2	2	Fragmento de inseto, inseto inteiro morto, larva de inseto morta
IN 24	Leste	Feira Livre	1	0	0	1	0	Ovo de inseto, fragmento de inseto, larva de inseto morta
IN 25	Leste	Hipermercado	0	0	0	0	0	Fragmento de inseto, inseto inteiro morto, larva de inseto morta, rotífero vivo
IN 26	Norte	Feira Livre	1	3	3	7	2	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmento de inseto, larva de inseto morta, ácaro morto
IN 27	Oeste	Feira Livre	1	0	0	1	0	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmento de inseto
IN 28	Oeste	Ceagesp	8	6	3	17	0	Fragmento de inseto, larva de inseto morta, inseto inteiro morto, ovo de inseto, rotífero morto, pólen
IN 29	Sul	Mercado	0	0	1	1	0	Fragmento de inseto, larvas de inseto, inseto inteiro morto,
IN 30	Leste	Hipermercado	1	1	3	5	0	Larva de inseto viva, pupa de inseto, rotíferos vivos e mortos, ácaros mortos, fragmento de inseto, larvas de inseto mortas, insetos inteiros mortos, ovos de inseto, algas verdes

IN: *in natura*

Anexo 18 - Dados brutos das análises de detecção de nematódeos em amostras de alface higienizadas

Nº Amostra	Região	Tipo de estabelecimento	Nematódeos isolados					Outras matérias estranhas
			A	B	C	Total	Vivos	
VMP 1	Norte	Hortifruti	0	0	0	0	0	Inseto inteiro morto, ovo de inseto, fragmentos de inseto, larva de inseto morta
VMP 2	Norte	Supermercado	0	0	0	0	0	1 ovo de inseto
VMP 3	Centro	Supermercado	1	0	0	1	0	
VMP 4	Oeste	Supermercado	0	0	0	0	0	
VMP 5	Norte	Mercado	0	0	0	0	0	
VMP 6	Oeste	Mercado	0	0	0	0	0	Rotíferos vivos
VMP 7	Sul	Feira livre	2	0	0	2	0	
VMP 8	Norte	Supermercado	0	1	1	2	0	Inseto inteiro morto
VMP 9	Sul	Supermercado	0	1	0	1	0	Larva de mosca morta, fragmentos de inseto, inseto inteiro morto, ovo de inseto
VMP 10	Oeste	Hortifruti	1	0	0	1	1	Inseto inteiro
VMP 11	Sul	Mercado	1	0	0	1	0	Larva de inseto, fragmentos de inseto
VMP 12	Centro	Hortifruti	2	3	0	5	1	Fragmentos de inseto, larva de inseto (díptero)
VMP 13	Norte	Mercado	0	1	0	1	0	
VMP 14	Sul	Hortifruti	0	0	0	0	0	Inseto inteiro morto
VMP 15	Leste	Supermercado	0	0	0	0	0	Ovo de inseto
VMP 16	Oeste	Ceagesp	0	0	0	0	0	Ovo de inseto
VMP 17	Norte	Sacolão	1	0	0	1	1	Inseto inteiro morto, fragmento de inseto e ovo de inseto
VMP 18	Leste	Supermercado	4	5	0	9	1	
VMP 19	Norte	Sacolão Municipal	0	0	0	0	0	
VMP 20	Leste	Sacolão	0	0	0	0	0	Inseto inteiro morto

VMP 21	Centro	Supermercado	0	0	0	0	0	Inseto inteiro morto, fragmento de inseto, ácaros
VMP 22	Oeste	Ceagesp	0	0	0	0	0	
VMP 23	Sul	Mercado	0	0	0	0	0	Insetos inteiros mortos (trips), fibras azuis
VMP 24	Oeste	Sacolão	0	0	0	0	0	
VMP 25	Sul	Supermercado	0	0	0	0	0	Insetos inteiros mortos (díptero e afídeos), ovo de inseto
VMP 26	Oeste	Mercado Municipal	0	0	0	0	0	Inseto inteiro morto (afídeo)
VMP 27	Sul	Supermercado	1	0	0	1	0	Insetos inteiros mortos (afídeos), fragmentos de insetos, larva de inseto (díptero), pólen
VMP 28	Norte	Supermercado	0	1	0	1	0	Insetos inteiros mortos (afídeos), Fragmentos de insetos
VMP 29	Sul	Mercado	0	0	0	0	0	
VMP 30	Oeste	supermercado	1	0	0	1	0	Insetos inteiros mortos (afídeos), fragmentos de insetos, rotíferos mortos

VMP: vegetal minimamente processado