



Adelaide Carina Moreira Pereira

Deteção dos protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* sp. em saladas pré-embaladas

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, sob a orientação da Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e a coorientação da Professora Gabriela Jorge da Silva, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Adelaide Carina Moreira Pereira

Deteção dos protozoários *Giardia lamblia*
e *Cryptosporidium* sp. em saladas pré-embaladas

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, sob a orientação da Professora Doutora Maria do Céu Sousa e a coorientação da Professora Gabriela Jorge da Silva, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Coimbra, Setembro de 2016

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob a orientação da Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e a coorientação da Professora Gabriela Jorge da Silva, no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar.

Agradecimentos

Quero agradecer a quem me ajudou e apoiou para que conseguisse realizar e finalizar este trabalho:

Agradeço a Deus a força, coragem e determinação para o término desta etapa.

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Maria do Céu Sousa, por todo o apoio e incentivo que me deu para que levasse este desafio até ao fim. Por todos os conhecimentos transmitidos, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Sem a sua orientação não conseguiria terminar esta fase tão importante da minha vida.

Agradeço à minha coorientadora Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva por todo o apoio e disponibilidade demonstrada na realização deste trabalho.

À colega de laboratório e doutoranda Clarissa Faria, por toda a ajuda que me deu, que foi muito importante na realização deste trabalho. Agradeço por toda a atenção dispensada para me auxiliar nos momentos em que mais precisei.

À Sandra Ferreira, assistente do laboratório, pela colaboração e apoio na preparação dos materiais necessários para a realização da parte laboratorial deste estudo e também por toda atenção prestada.

Também aos restantes colegas de laboratório, pelo companheirismo demonstrado e o apoio dado sempre que necessário.

A todas as minhas colegas de trabalho, em especial à minha chefe Lúcia Rodrigues pela compreensão e disponibilidade dada para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos que me motivaram para finalizar este projeto.

Agradeço aos meus pais, irmão e avós por todo o apoio e coragem que me deram que contribuiu também para que eu conseguisse realizar este trabalho.

Por fim, mas não menos importante, agradeço ao Ivo, meu marido e companheiro de jornada, pela força e coragem que me deu nos momentos mais difíceis, e quando eu pensava que não conseguia, ele nunca me deixou desistir. Contribuiu em muito, para que conseguisse finalizar esta tese de mestrado.

Muito Obrigada a todos!

Índice

Índice de Tabelas	iii
Índice de Figuras	v
Abreviaturas	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Capítulo 1 - Introdução	1
1. Introdução	3
1.1. Segurança alimentar	3
1.2. Doenças transmitidas por alimentos	4
1.3. Fatores de risco associados ao consumo de saladas pré - embaladas e Segurança Alimentar	9
1.4. <i>Giardia lamblia</i>	13
1.5. <i>Cryptosporidium</i> sp.	17
Capítulo 2 - Objetivos	23
2. Objetivos	25
Capítulo 3 - Material e Métodos	27
3. Material e Métodos	29
3.1. Caracterização e processamento das amostras	29
3.2. Extração de ADN	30
3.3. PCR quantitativo em tempo real	32
3.3.1. <i>Giardia lamblia</i>	32
3.3.2. <i>Cryptosporidium</i> sp.	34
3.4. Nested-PCR	34
3.4.1. <i>Giardia lamblia</i>	34
3.4.2. <i>Cryptosporidium</i> sp.	36
3.5. Sequenciação	37
3.6. Determinação do limite de detecção de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> no qPCR e nested-PCR	37

3.6.1. <i>Giardia lamblia</i>	37
3.6.2. <i>Cryptosporidium</i> sp.	38
3.7. Visualização dos fragmentos de ADN amplificados	38
Capítulo 4 - Resultados	39
4. Resultados	41
4.1. Detecção de <i>Giardia lamblia</i> por qPCR e nested-PCR	41
4.2. Detecção de <i>Cryptosporidium</i> por qPCR e nested-PCR	46
4.3. Identificação de espécies/genótipos de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> por sequenciação	47
4.4. Determinação do limite de deteção de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> no qPCR e nested-PCR	51
4.4.1. <i>Giardia lamblia</i>	51
4.4.2. <i>Cryptosporidium</i> sp.	52
Capítulo 5 - Discussão	55
5. Discussão	57
Referências Bibliográficas	63
Anexos	73
Anexo I	75

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais bactérias associadas a doenças transmitidas por alimentos (Adaptada de ASAE, 2016)	5
Tabela 2. Principais vírus associados a doenças transmitidas por alimentos (Adaptada de ASAE, 2016)	6
Tabela 3. Principais parasitas associados a doenças transmitidas por alimentos (Adaptada de ASAE, 2016)	7
Tabela 4. Classificação dos microrganismos, de acordo com o seu perigo e difusão (Adaptada de ASAE, 2016)	8
Tabela 5. Prevalência das doenças transmitidas por alimentos (Adaptada de ASAE, 2016)	9
Tabela 6. Exemplos de surtos epidemiológicos de infecções provocadas por microrganismos presentes em saladas e vegetais (Adaptada de Taban e Halkman, 2011)	11
Tabela 7. Espécies de <i>Giardia</i> sp. e seus respectivos hospedeiros (Adaptado de Martins, 2010)	14
Tabela 8. Genótipos ou assemblages, de <i>Giardia lamblia</i> e seus respectivos hospedeiros (Adaptado de Lasek-Nesselquist <i>et al.</i> , 2010, Monis <i>et al.</i> , 1999, Thompson, 2004)	14
Tabela 9. Exemplos de espécies de <i>Cryptosporidium</i> e seus respectivos hospedeiros (Adaptado de Chalmers e Katzer, 2013 e de Plutzer e Karanis, 2009)	18
Tabela 10. Exemplos de surtos de origem hídrica provocados por <i>Cryptosporidium</i> (Franco, 2007)	20
Tabela 11. Identificação e características das amostras de saladas	29
Tabela 12. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para amplificação de fragmentos dos genes <i>gdh</i> e <i>orfC4</i> de <i>G. lamblia</i> e do gene <i>18S rDNA</i> de <i>Cryptosporidium</i> sp.	32
Tabela 13. Composição da solução utilizada na reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) na detecção de <i>G. lamblia</i> e <i>Cryptosporidium</i> sp.	33

Tabela 14. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados no nested-PCR para amplificação de fragmentos do gene <i>ssu rRNA</i> de <i>Giardia lamblia</i> e do gene <i>ssu rRNA</i> de <i>Cryptosporidium</i> sp.	35
Tabela 15. Composição da solução utilizada na reacção de nested-PCR para <i>G. lamblia</i> e <i>Cryptosporidium</i> sp.	36
Tabela 16. Detecção de <i>Giardia lamblia</i> nas saladas por qPCR e nested-PCR	45

Lista de Figuras

Figura 1. Trofozoíto (1) e quisto (2) de <i>Giardia lamblia</i>	15
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	16
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> sp.	19
Figura 4. Esquema geral do procedimentos de extração de ADN	31
Figura 5. Curvas de amplificação (A) e curvas de <i>melting</i> (B) do qPCR dos genes <i>gdh</i> (a) e <i>orfC4</i> (b) do genótipo A (WBC6) de <i>Giardia lamblia</i> .	41
Figura 6. Curvas de amplificação (A) e curvas de <i>melting</i> (B) do qPCR dos genes <i>gdh</i> (a,b,c,d) e <i>orfC4</i> (e,f) do genótipo B de <i>Giardia lamblia</i>	42
Figura 7. Curvas de amplificação (A) e curvas de <i>melting</i> (B) do qPCR do gene <i>gdh</i> do genótipo A de <i>Giardia lamblia</i> nas amostras de saladas	43
Figura 8. Separação electroforética em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio dos produtos do nested-PCR do gene <i>ssu rRNA</i> de <i>G. lamblia</i>	44
Figura 9. Curvas de amplificação (A) e curvas de <i>melting</i> (B) do qPCR do gene <i>18S rDNA</i> de <i>Cryptosporidium</i> sp.	46
Figura 10. Separação electroforética em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio dos produtos do nested-PCR do gene <i>ssu rRNA</i> de <i>Cryptosporidium</i> sp.	47
Figura 11. Alinhamento múltiplo de fragmentos de sequências do gene <i>ssu rRNA</i> de <i>G. lamblia</i> da estirpe referência Portland-I (M54878) e da amostra Fm2	48
Figura 12. Alinhamento múltiplo de fragmentos de sequências do gene <i>18 S rDNA</i> da amostra de salada Vm1	49
Figura 13. Alinhamento múltiplo de fragmentos de sequências do gene <i>ssu rRNA</i> da amostra Va1	50
Figura 14. Separação electroforética em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio dos produtos do nested-PCR do gene <i>ssu rRNA</i> de diluições de ADN de <i>G. lamblia</i> referência (WBC6)	51
Figura 15. Separação electroforética em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio dos produtos amplificados no qPCR do gene <i>18S</i>	52

rDNA de *Cryptosporidium* a partir de diferentes concentrações de ADN (números crescente de ooquistos)

Figura 16. Separação electroforética em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio dos produtos amplificados (825pb) no nested-PCR do gene *ssu rRNA* de *Cryptosporidium* a partir de diferentes concentrações de ADN (diferentes números de ooquistos) 53

Figura 17. Separação electroforética em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio dos produtos amplificados (825pb) no nested-PCR do gene *ssu rRNA* de *Cryptosporidium* a partir de diferentes concentrações de ADN (diferentes números de ooquistos) 53

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> - Albumina de soro bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
EUA	Estados Unidos da América
<i>gdh</i>	Gene glutamato desidrogenase
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i> - Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controlo
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
<i>orfC4</i>	<i>Open read frame C4 gene</i> - Gene quadro aberto de leitura C4
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da Polimerase
RASFF	<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i> - Sistema de Alerta Rápido para alimentos para consumo humano e animal
rpm	Rotações por minuto
<i>ssu rRNA</i>	Gene da subunidade menor do ARN ribossomal
TBE	Tris base, ácido bórico e EDTA

Resumo

As saladas pré-embaladas, prontas para consumo, são cada vez mais procuradas pelos consumidores, por serem de fácil e rápida utilização, não necessitando de processamento, com um cariz muito prático que motiva a aquisição pelos consumidores em geral.

As contaminações microbianas estão muitas vezes associadas ao consumo de saladas e são responsáveis pela grande parte das doenças transmitidas por alimentos. Como exemplos, destacam-se as parasitoses intestinais, provocadas por diversos parasitas, nomeadamente *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* sp.. Estes parasitas são transmitidos pela via fecal-oral, por contacto direto entre indivíduos infetados ou animal-pessoa ou indiretamente através da ingestão de água e alimentos contaminados. Os quistos de *Giardia* sp e ooquistos de *Cryptosporidium* sp. são muito resistentes às condições do meio ambiente e também aos tratamentos efetuados à água para consumo humano, podendo permanecer durante muito tempo no meio-ambiente, contaminando a água, solos e posteriormente os alimentos.

Em Portugal não está descrita a pesquisa destes parasitas em alimentos. Assim, este estudo teve como objetivo detetar *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em saladas pré-embaladas e prontas a consumir, aplicando técnicas de biologia molecular, de modo a conhecer o nível de contaminação das saladas.

Foram adquiridas, aleatoriamente, 24 amostras de saladas de três marcas diferentes e de vegetais variados, durante o período de junho a setembro de 2015 em hipermercados de Coimbra. A extração do ADN foi realizada utilizando o kit comercial QIAamp DNA Stool mini kit (Quiagen), e a deteção de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* sp. foi realizada através de técnicas de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e nested-PCR. O limite de deteção de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* sp. das técnicas de PCR foi determinado e a identificação das espécies/genótipos foi realizada por sequenciação.

O parasita *G. lamblia* foi detetado em uma amostra de salada e por sequenciação foi identificado como genótipo A (100% homologia com Portland-1). O limite de deteção na técnica de nested-PCR foi de 30,5 pg/ml de ADN. Não foi identificado *Cryptosporidium* sp. em nenhuma amostra de salada e o limite de deteção foi de 1 ooquisto na técnica de qPCR e 100 ooquistos na técnica nested-PCR.

Conclui-se, portanto, que é necessário estabelecer medidas de prevenção e controlo destes parasitas em todo o setor de produção, processamento, embalamento e transporte das saladas pré-embaladas e prontas para consumo humano.

Palavras-chave: Saladas pré-embaladas, Segurança Alimentar, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*, qPCR, nested-PCR, sequenciação.

Abstract

The ready-to-eat salads are in increasing demand by consumers because they are easy and quick to use and do not require processing, have a practical nature that motivate the purchase by consumers in general.

Microbial contaminations are often associated with consumption of salads and are responsible for foodborne diseases. Among the foodborne diseases, there are the intestinal parasitosis caused by various parasites, including, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* sp.. These parasites are transmitted by the fecal-oral route, by direct contact between infected humans or animal-person or indirectly through ingestion of water and food contaminated. The cysts of *Giardia* sp. and oocysts of *Cryptosporidium* sp. are very resistant to environmental conditions and also to water treatments for human consumption and remain for a long time in the environment, contaminating water, soil and subsequently the food.

In Portugal, research of these parasites in food is not described. This study aimed to detect *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in ready-to-eat salads, applying techniques of molecular biology in order to study the level of contamination in salads.

Twenty four samples of ready-to-eat salads of three different brands and assorted vegetables were randomly purchased during the period June to September 2015, in hypermarkets of Coimbra. The DNA extraction was performed using the commercial kit QIAamp DNA Stool mini kit (Qiagen), and the detection of *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. was performed using real-time quantitative PCR (qPCR) and nested-PCR techniques. The limit of detection of the PCR techniques was determined and the identification of species/genotypes was performed by sequencing.

G. lamblia parasite was detected in one salad sample and was identified as genotype A by sequencing (100% sequence homology with Portland-1). The limit of detection of nested-PCR was about 30.5 pg / ml DNA. *Cryptosporidium* sp. was not identified in any salad and the detection limit was of 1 oocyst in qPCR and 100 oocysts in nested-PCR.

In conclusion, it is necessary establish prevention and control measures for these parasites throughout the manufacturing industry, processing, packaging and transport of ready-to-eat salads for human consumption.

Keywords: ready-to-eat salads, Food Safety, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*, qPCR, nested-PCR, sequencing.

Capítulo I

Introdução

I. Introdução

I.1. Segurança alimentar

Ao longo dos últimos anos, tem-se assistido a uma crescente preocupação com a segurança alimentar. Cada vez mais, a sociedade em geral se preocupa em consumir alimentos seguros, que não tragam consequências nefastas para a saúde.

A segurança alimentar é um direito em que todas as pessoas devem acreditar, assumindo que no dia-a-dia os alimentos que consomem são inócuos e próprios para consumo humano (WHO/FAO, 2003). As doenças e os danos provocados pelos alimentos podem ser apenas desagradáveis e causar ligeiras indisposições, ou no pior cenário serem fatais (WHO/FAO, 2003). Para salvaguardar os direitos dos consumidores no âmbito da segurança alimentar, foram surgindo organismos públicos e grupos de trabalho que estabeleceram normas e regulamentação.

Assim, surgiu o *Codex Alimentarius*, que em latim significa Código ou Lei dos Alimentos, que consiste num conjunto de normas alimentares internacionais (WHO/FAO, 2003). Segundo o *Codex Alimentarius* a segurança alimentar define-se como a garantia de que o alimento não causará danos ao consumidor, desde que seja preparado e/ou consumido de acordo com o uso a que se destina (WHO/FAO, 2003). Ao mesmo tempo, surgiu a legislação alimentar (Reg. n° 852/2004) com o objetivo de promover e defender a Segurança Alimentar de forma a manter um elevado nível de proteção da vida e da saúde humana.

Em 2002, foi fundada pela União Europeia, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA - European Food Safety Authority), com o objetivo de desenvolver fundamentos científicos no âmbito da segurança alimentar e fazer a divulgação dos riscos associados à cadeia alimentar. Deste modo, é responsável pela gestão do risco alimentar e também pela divulgação das descobertas científicas neste âmbito ao público em geral (ASAE, 2015).

As doenças veiculadas pelos alimentos representam um problema de saúde pública a nível mundial e cada vez mais a sociedade em geral se preocupa com a sua prevenção e com o cumprimento das normas e legislação em vigor no âmbito da segurança alimentar (WHO, 2016).

I.2. Doenças transmitidas por alimentos

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorrem devido a contaminações de alimentos. As contaminações podem ter três principais origens: física (restos de metais, madeira, cabelos, e outros objetos que possam cair nos alimentos); química (produtos químicos, contaminantes químicos, como resíduos de antibióticos e pesticidas, contaminantes ambientais); biológica (contaminação microbiológica, pragas; microbiológica, bactérias, vírus, fungos, parasitas) (ASAE, 2016). Estas doenças e as suas consequências para a saúde humana são um problema emergente em todo o mundo, havendo cada vez mais casos de infeções veiculadas pelos alimentos (Oliveira, 2010).

Em 2014, foram relatados 5251 casos de doenças de origem alimentar, incluindo, as doenças alimentares veiculadas pela água (EFSA, 2015). Segundo a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), cerca de 90% das doenças transmitidas por alimentos são provocadas por microrganismos. Em todos os alimentos é possível encontrar microrganismos e a sua transmissão resulta, na maior parte das vezes, da utilização de deficientes práticas de higiene e de metodologias incorretas nas últimas etapas de preparação/confeção e distribuição dos alimentos. São conhecidos muitos géneros e espécies de bactérias (Tabela I), vírus e parasitas que causam doenças de origem alimentar, mas apenas alguns aparecem associados a estas doenças com maior frequência (ASAE, 2016).

Tabela I. Principais bactérias associadas a doenças transmitidas por alimentos (Adaptada de ASAE, 2016).

Género	Espécies/Estirpes	Alimentos frequentemente associados	Alimentos notificados no RASFF* (Março 2005 - Agosto 2006)
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>	Arroz, cereais, pratos de carne, vegetais, alimentos em contacto com o solo ou com pó	Cacau, leite, massas semi-frescas, mistura de especiarias, peixe
	<i>B. licheniformis</i>		Alimentação dietética (crianças)
<i>Brucella</i>		Leite cru, derivados de animais contaminados	
<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	Alimentos proteicos crus ou pouco cozinhados, lacticínios	Coelho, frango, manteiga
<i>Clostridium</i>	<i>C. botulinum</i>	Carnes insuficientemente curadas ou sem conservantes, conservas caseiras de carnes ou vegetais	
	<i>C. perfringens</i>	Alimentos aquecidos a baixas temperaturas	
<i>Escherichia</i>	<i>E.coli</i>	Água ou alimentos com contaminação fecal	Carne de vaca, Chá de limão, queijo <i>Brie</i> , mexilhão, salame, produtos à base de leite
<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Leite, derivados de leite, saladas	Bacon, carne de cavalo, carne de vaca cozinhada, Filetes, linguiça, paté, queijo de leite cru, queijo fumado, peixe, salame, salmão fumado, <i>sushi</i>
<i>Salmonella</i>	<i>S. enteritidis</i>	Frango, pato, peru, ovos	Carne de porco, carne de vaca, codornizes, frango, pato, peru e ovos
	<i>S. typhimurium</i>		
<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae</i>	Saladas, leite, aves, produtos hortícolas	
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	Carne, leite, ovos e derivados, associado à manipulação- alimentos ricos em proteína e água	Marisco, peixe, queijo de leite cru
<i>Streptococcus</i>	<i>S. pyogenes</i>	Leite cru, gelados, saladas, mariscos	
<i>Vibrio</i>	<i>V. cholerae</i>	Peixe, marisco e moluscos	Camarão
	<i>V. parahaemolyticus</i>	crus ou insuficientemente cozinhados	
	<i>V. vulnificus</i>		
	<i>V. alginolyticus</i>		Camarão
<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	Leite cru, Aves, Carnes, mariscos, vegetais	

*RASFF - *Rapid Alert System for Food and Feed*- Sistema de Alerta Rápido para alimentos para consumo humano e animal.

Existem alguns vírus que são causadores de doenças transmitidas por alimentos, embora não haja possibilidade de se multiplicarem nos alimentos (Tabela 2). Os vírus que estão associados com maior frequência a doenças transmitidas por alimentos são os

causadores da Hepatite A e E, os rotavírus (estão muito associados a casos de diarreia infantil) e o vírus de Norwalk (também designado por norovírus ou calcivírus) que provocam gastroenterites (ASAE, 2016).

Tabela 2. Principais vírus associados a doenças transmitidas por alimentos (Adaptada de ASAE, 2016).

Vírus	Alimentos frequentemente associados	Alimentos notificados no RASFF* (Março 2005 - Agosto 2006)
Hepatite A	Água, marisco, saladas	
Hepatite E	Água	
Rotavírus	Fruta, saladas	
Vírus de Norwalk	Água	Framboesas, ostras cruas

*RASFF - *Rapid Alert System for Food and Feed* - Sistema de Alerta Rápido para alimentos para consumo humano e animal.

Entre os principais parasitas causadores de doenças de origem alimentar estão os protozoários *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* e o helminta *Trichinella spiralis* (Tabela 3) (ASAE, 2016). Dentro deste tipo de doenças de origem alimentar, destacam-se as parasitoses intestinais, que são consideradas um grande problema de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento, onde as condições higiénicas e sanitárias não são as melhores. Estas doenças estão muitas das vezes associadas a quadros clínicos de diarreia crónica e desnutrição (Ludwig *et al.*, 1999).

Tabela 3. Principais parasitas associados a doenças transmitidas por alimentos (Adaptada de ASAE, 2016).

Género	Espécies	Alimentos frequentemente associados	Alimentos notificados no RASFF* (Março - Agosto 2006)
<i>Cryptosporidium</i>	<i>C. parvum</i>	Leite, água, vegetais,	
<i>Diphyllobothrium</i>		Salmão, outros peixes	
<i>Entamoeba</i>	<i>E. histolytica</i>	Alimentos ou água	
<i>Giardia</i>	<i>G. lamblia (ou intestinalis)</i>	expostos a contaminação fecal	
<i>Ascaris</i>	<i>A. lumbricoides</i>		
<i>Anisakis</i>	<i>A. simplex</i>	Salmão, bacalhau, badejo, arenques, etc. (encontra-se no músculo de muitos peixes)	Bacalhau seco, sardas, tamboril
<i>Taenia</i>	<i>T. saginata</i> <i>T. solium</i>		
<i>Trichinella</i>	<i>T. spiralis</i>	Javali, porco, músculo de animais carnívoros	
<i>Cyclospora</i>	<i>C. cayetanensis</i>	Água, alimentos contaminados com fezes	

*RASFF - *Rapid Alert System for Food and Feed* - Sistema de Alerta Rápido para alimentos para consumo humano e animal.

De acordo com o *National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods* (2004), os microrganismos podem-se classificar consoante o seu risco e difusão (Tabela 4). Com alto risco, salientam-se os parasitas *Taenia solium*, *Trichinella spiralis* e de risco moderado de alta difusão, o parasita *Cryptosporidium parvum*.

Tabela 4. Classificação dos microrganismos, de acordo com o seu perigo e difusão (Adaptada de ASAE, 2016).

Alto Risco	Risco moderado / Alta difusão	Risco moderado/ Difusão limitada
<i>Clostridium botulinum</i> tipos A, B, E, F	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Salmonella typhi</i> e <i>paratyphi</i> A, B	<i>Shigella</i> sp.	<i>Clostridium perfringens</i>
Vírus - Hepatite A e E	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EEC)	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Vibrio Cholerae</i> non-01
<i>Brucella suis</i>	Rotavírus	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Vibrio cholerae</i> 01	Vírus Norwalk	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Taenia solium</i>	<i>Diphyllobothrium latum</i>	<i>Taenia saginata</i>
<i>Trichinella spiralis</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Trichinella spiralis</i>
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Diphyllobothrium latum</i>

A prevalência das doenças infecciosas transmitidas através de alimentos tem sido variável ao longo do tempo. Por exemplo, no início do século passado, doenças como a cólera, febre tifóide e a tuberculose eram doenças muito frequentes e que traziam graves consequências à saúde pública. As melhorias efetuadas no âmbito da manipulação e tratamento de alimentos, nomeadamente a pasteurização do leite, a confeção de conservas de forma segura, os tratamentos de desinfecção da água, o saneamento público e todas as restantes melhorias neste âmbito, proporcionaram um controlo mais efetivo destas doenças, contribuindo assim para o aumento dos níveis de segurança alimentar (ASAE, 2016).

Nas últimas duas décadas foram descobertas outras doenças com origem nos alimentos, como o caso de diarreias associadas ao consumo de framboesas contaminadas com *Cycosplora*, em 1996 na Guatemala e em 1998 em *Galveston Bay*, surtos associados ao consumo de ostras contaminadas com uma nova estirpe da bactéria *Vibrio parahaemolyticus* (ASAE, 2016).

O aparecimento de novas doenças de origem alimentar causadas por microrganismos está associado a vários fatores, como por exemplo a facilidade com que os microrganismos se difundem, as transformações a que estão sujeitos que lhes conferem mais resistência e proporcionam a sua disseminação, os métodos laboratoriais cada vez mais desenvolvidos que permitem identificar microrganismos anteriormente desconhecidos (ASAE, 2016).

Deste modo, atualmente existem doenças novas de origem alimentar, outras que reaparecem após alguns anos de ausência (re-emergentes), outras que aparecem esporadicamente e algumas que já estão consideradas erradicadas (Tabela 5) (ASAE, 2016).

Tabela 5. Prevalência das doenças transmitidas por alimentos (Adaptada de ASAE, 2016).

Doenças transmitidas por alimentos	
Prevalência crescente	Prevalência baixa ou nula
Listeriose (<i>Listeria monocytogenes</i>)	Cólera (<i>Vibrio cholerae</i>)
Campilobacteriose (<i>Campylobacter jejuni</i>)	Teníase (<i>Taenia saginata</i>)
Intoxicações por <i>Escherichia coli</i> ou por <i>Yersinia enterocolitica</i>	Triquinose (<i>Trichinella spiralis</i>)

1.3. Fatores de risco associados ao consumo de saladas pré-embaladas e segurança alimentar

O consumo de vegetais está muito associado à adoção, cada vez mais frequente, de estilos de vida saudáveis pela população em geral. Este fator faz com que as pessoas procurem cada vez mais incorporar neste estilo de vida uma alimentação equilibrada e saudável, recorrendo aos vegetais. O consumo de saladas é muito recomendado pela maior parte dos nutricionistas por serem uma fonte rica de fibras, vitaminas, minerais e fitonutrientes, essenciais para uma alimentação saudável (Yamoudy *et al.*, 2015). O seu consumo regular, em quantidades suficientes, pode prevenir doenças cardiovasculares e alguns câncros (Taban e Halkman, 2011).

A procura deste tipo de alimentos, minimamente processados, tem aumentado nos últimos 10 anos pelo seu cariz prático, acessível e de fácil consumo e tornou-se um produto muito "popular" entre os consumidores (Santos *et al.*, 2010; Taban e Halkman, 2011; Soderqvist *et al.*, 2016). Os consumidores têm optado por este tipo de saladas pelo facto de terem poucas calorias e alto valor dietético (Caponigro *et al.*, 2010). Por todas estas razões, é espectável que o consumo de saladas, principalmente as pré-embaladas e prontas a consumir, continue a aumentar.

As saladas pré-embaladas são alimentos minimamente processados que passam por várias etapas até serem embalados, nomeadamente, a seleção da matéria-prima, pré-lavagem, preparação (corte), higienização e desinfeção, enxaguamento, secagem e posteriormente o acondicionamento em embalagens permeáveis. Estas saladas têm de ser transportadas e

armazenadas sob condições de temperatura específicas (2°C a 4°C). A atmosfera modificada induzida pelas embalagens permeáveis, os altos níveis de humidade e a temperatura baixa fazem abrandar o metabolismo destes vegetais e ajudam a preservar a frescura e o valor nutritivo, pelo menos durante uma semana (Caponigro *et al.*, 2010).

As mudanças na agricultura, no processamento, na preservação e distribuição dos alimentos, especialmente neste tipo de saladas pré-embaladas, associadas também ao desenvolvimento de técnicas de *marketing* à escala global, têm proporcionado o crescimento das indústrias deste setor, levando a que haja cada vez mais uma vasta gama de saladas prontas para consumo (Taban e Halkman, 2011).

As saladas pré-embaladas são alimentos frescos e perecíveis que, se não for efetuada corretamente a sua lavagem e desinfeção, podem levar ao desenvolvimento de microrganismos e proporcionar a sua degradação. As saladas, em geral, são potenciais fontes de microrganismos patogénicos, quer pelo seu meio de crescimento e desenvolvimento (solo), quer pelo processamento e manipulação que está associada a estes alimentos, especialmente os que são previamente lavados, embalados e comercializados como produto acabado para consumo imediato (Dixon *et al.*, 2012).

Durante as últimas duas décadas, ocorreram muitos surtos de gastroenterites causados por microrganismos patogénicos presentes em saladas. Uma vasta gama de saladas e vegetais têm sido associados a surtos de infeções pelo Centro de Controlo e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos - *United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* (Tabela 6) (Taban e Halkman, 2011). A proporção destes surtos com origem neste tipo de saladas tem tendência a aumentar, devido ao incremento do consumo das saladas. Em muitos países estas saladas pré-embaladas são produzidas à escala industrial, sendo vendidas muito rapidamente.

Este tipo de vegetais retém a microflora normal, mesmo após o seu processamento, e muitas das vezes estão associados microrganismos patogénicos, que representam um risco potencial para a segurança alimentar (Taban e Halkman, 2011).

Tabela 6. Exemplos de surtos epidemiológicos de infecções provocadas por microrganismos presentes em saladas e vegetais (Adaptada de Taban e Halkman, 2011).

Tipo de vegetal	Microrganismo	Ano	Localização
Alface	<i>Escheria coli</i> O157:H7	1995	Estados Unidos da América (EUA)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	1979	EUA
	<i>Shigella sonnei</i>	1983	EUA
	<i>Salmonella typhimurium</i> DT104	1994	Noruega
	<i>Salmonella</i> Newport	2005	Espanha
	<i>Campylobacter jejuni</i>	1996	EUA
Folha de alface "baby"	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1997	EUA
Alface picada	<i>Shigella sonnei</i>	1986	EUA
Alface "iceberg"	<i>Shigella sonnei</i>	1994	Noruega, Suécia e Reino Unido
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	1995	Canadá
Salada de alface	Vírus da Hepatite A	1986	EUA
	<i>Giardia</i>	1989	EUA
Salsa	<i>Shigella sonnei</i>	1998	EUA
Manjeriço	<i>Salmonella</i> Senftenberg	2007	Israel
	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1997	EUA

Existem vários fatores que podem influenciar a contaminação das saladas, como a fertilização das terras com fezes de animais e a origem da água de rega, que pode ser tratada ou não e pode também estar contaminada com fezes de animais. A escolha do local para cultivo destes vegetais é um fator muito importante que pode influenciar a segurança alimentar, uma vez que, é necessário perceber se esses campos de cultivo, já foram utilizados por animais domésticos ou selvagens, que podem ter contaminado os solos com microrganismos patogénicos (Taban e Halkman, 2011). Neste sentido, podem estar associados perigos biológicos, na fase de cultivo e crescimento destes vegetais, nomeadamente o desenvolvimento de bactérias patogénicas, como a *Escherichia coli* enterotoxigénica e enterohemorrágica, a *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Shigella*, *Yersinia*, e também a disseminação de parasitas, como *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Giardia* (protozoários) e alguns helmintas (Taban e Halkman, 2011).

As deficientes práticas de higiene dos manipuladores durante o cultivo e processamento destes vegetais também são fatores que contribuem para a contaminação (Caponigro et al., 2010; Taban e Halkman, 2011; Dixon, et al., 2012). A água utilizada na lavagem prévia dos legumes pode também ser um veículo de parasitas (Dixon et al., 2012).

Os microrganismos patogénicos podem resistir à ação de desinfetantes aplicados nas higienizações das saladas pré-embaladas, devido à sua retenção nas irregularidades da superfície dos vegetais, nas pequenas lesões do tecido vegetal e nos biofilmes. Também as baixas temperaturas e atmosfera modificada deste tipo de saladas pré-embaladas não é suficiente para evitar o desenvolvimento bactérias psicotróficas (que se desenvolvem a temperaturas baixas, entre 0°C e 7°C) e algumas delas são patogénicas, como é o caso de *Listeria* sp. (Caponigro *et al.*, 2010).

As saladas pré-embaladas são reconhecidas como alimentos de risco, devido à possibilidade de contaminação com bactérias patogénicas, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia* sp., e com fungos e leveduras (Caponigro *et al.*, 2010; Yamoudy *et al.*, 2015).

No seguimento de um surto de Salmonelose, na Noruega, foi efetuada uma investigação epidemiológica, demonstrando-se a associação do surto ao consumo de saladas pré-embaladas (Vestrheim *et al.*, 2014). Este acontecimento realça que existe risco de infeção provocada pelo consumo de saladas contaminadas por microrganismos patogénicos, mesmo após terem sido processadas, higienizadas e embaladas (Vestrheim *et al.*, 2014).

Para além das bactérias também há possibilidade de transmissão de vírus, como por exemplo o vírus da Hepatite A, o Norovírus, que podem estar presentes na água de rega e também nos solos, sendo responsáveis por muitos casos de gastroenterites especialmente em crianças (Taban e Halkman, 2011). No entanto, existe uma maior preocupação com as bactérias, uma vez que as consequências para a saúde são mais graves e normalmente afetam um número maior de pessoas a nível mundial (Taban e Halkman, 2011). No que diz respeito à contaminação por vírus, como nas saladas não são utilizados processamentos térmicos, cozedura ou outro, o risco é elevado, uma vez que não há destruição dos vírus (Takahashi *et al.*, 2016).

O facto de os vegetais crus não serem corretamente higienizados e desinfetados, faz com que o homem fique vulnerável a infeções provocadas por parasitas, nomeadamente protozoários e helmintas. A contaminação fecal destes alimentos, que são ingeridos sem nenhum processamento térmico, constitui um fator crucial na epidemiologia das parasitoses (Shuval *et al.*, 1984).

Os ooquistos, quistos, ovos e larvas de parasitas são muito resistentes às condições ambientais, podendo permanecer viáveis por grandes períodos de tempo na água, solo e nas culturas (Shuval *et al.*, 1984).

Os protozoários *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. possuem um elevado potencial para causar doenças gastrointestinais pela contaminação da água e de alimentos (Rose e Slifko, 1999). Vários estudos detetaram *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em vegetais e frutas (Dixon et al., 2012). Quistos de *Giardia* sp. foram identificados em amostras de alface e de morangos (Erdogrul e Sener, 2004) e *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. foram detetados em vegetais e legumes colhidos diretamente das culturas, de mercados e de vegetais embalados prontos para consumo (Alonso e Cuesta, 2010; Dixon et al., 2012). Contudo, a deteção destes protozoários tem sido realizada maioritariamente em vegetais não embalados.

A presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* nos vegetais pode ter origem na água de irrigação contaminada com quistos e ooquistos (muito resistentes no meio ambiente). De facto, há um risco muito elevado de contaminação das culturas com as formas parasitárias presentes na água (Amorós et al., 2010).

1.4. *Giardia lamblia*

Giardia lamblia (*Giardia duodenalis* ou *Giardia intestinalis*) é um dos parasitas intestinais mais comuns do homem que causa a doença gastrointestinal. Aproximadamente 200 milhões de pessoas na Ásia, África e América Latina têm infeções sintomáticas. Nos países desenvolvidos, as taxas de infeção são de 1-7%, e nos países em desenvolvimento as taxas aumentam para 8% a 30% (Feng e Xiao, 2011).

O parasita *Giardia* foi descrito pela primeira vez em 1681 por Antonie van Leeuwenhoek ao examinar as próprias fezes ao microscópio. Em 1859 foi descrito como *Cercomonas intestinalis* quando observados por Vilem Dusan Lambl. A designação *Lambli* *intestinalis* foi criada em 1888 por Raphael Anatole Émile Blanchard e, em 1915, Charles Wardell Stiles introduziu o nome *Giardia lamblia* para honrar o trabalho realizado pelo Professor A. Giard em Paris e Dr. Lambl em Praga. Hoje, os organismos que infetam os seres humanos são referidos como *G. lamblia*, *G. intestinalis* ou *G. duodenalis* (Ford, 2005).

Giardia sp. é um protozoário, unicelular flagelado que pertence ao Filo *Sarcomastigophora*, Classe *Zoomastigophora*, ordem *Diplomonadida*, família *Hexamitidae* (Thompson et al., 2000). Existem várias espécies de *Giardia*, sendo que cada espécie tem hospedeiros diferentes (Tabela 7).

Tabela 7. Espécies de *Giardia* sp. e seus respectivos hospedeiros (Adaptado de Martins, 2010).

Espécies	Hospedeiro
<i>Giardia lamblia</i> ou <i>duodenalis</i>	Homem, mamíferos domésticos e selvagens
<i>Giardia agilis</i>	Anfíbios
<i>Giardia muris</i>	Roedores
<i>Giardia ardeae</i>	Aves
<i>Giardia psittaci</i>	Aves
<i>Giardia microti</i>	Roedores

Giardia lamblia é considerada uma espécie complexa, estando já identificados oito grupos genéticos distintos (A-H), denominados genótipos ou assemblages (Monis *et al.*, 1999, Thompson, 2004; Sprong *et al.*, 2009) (Tabela 8). No homem, apenas têm sido encontrados os genótipos A e B, sendo estes alvo da maioria dos estudos de *Giardia* em amostras de fezes e alimentos (Sprong *et al.*, 2009). Os outros genótipos são suscetíveis de serem específicos do hospedeiro, como os genótipos C e D identificados principalmente em cães e outros canídeos, genótipo E em gado, assemblage F em gatos, genótipo G em ratos e genótipo H em mamíferos marinhos (Tabela 8) (Monis *et al.*, 1999; Thompson, 2004; Caccio e Ryan, 2008; Sprong *et al.*, 2009; Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010).

Tabela 8. Genótipos ou assemblages, de *Giardia lamblia* e seus respectivos hospedeiros (Adaptado de Monis *et al.*, 1999; Thompson, 2004; Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010).

Genótipo (Assemblage)	Hospedeiro
A	Homem, suínos, cão, gato, bovinos, ovinos, veados, castores, alces, cavalo
B	Homem, suínos, cão, gato, bovinos, ovinos, cavalo, coiotes, chinchilas, castores e ratos
C	Cão, coiotes e lobo
D	Cão, coiotes e lobo
E	Bovinos, caprinos, suínos,
F	Gato
G	Rato
H	Mamíferos marinhos

Giardia é um parasita monoxeno, ou seja, não necessita de um hospedeiro intermediário. Durante o ciclo de vida, *Giardia lamblia* apresenta duas estruturas

morfologicamente distintas, os quistos que medem de 8 a 14 μm de comprimento e 7 a 10 μm de largura, e os trofozoítos que medem cerca de 10 a 20 μm de comprimento e 5 a 15 μm de largura (Fig. 1) (Thompson, 2004).

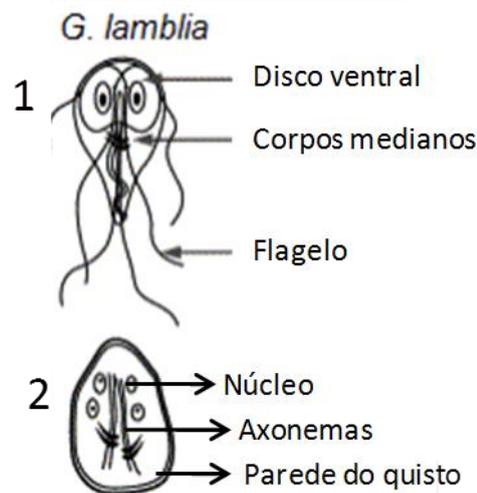


Figura 1. Trofozoíto (1) e quisto (2) de *Giardia lamblia* (Adaptado de Thompson, 2004).

A transmissão ocorre pela via fecal-oral, através do contacto direto entre homem-homem e homem-animal ou indiretamente através da ingestão de água e alimentos contaminados com os quistos (Robertenson *et al.*, 2010) (Fig. 2).

Os quistos, depois de ingeridos, passam pelo ambiente ácido do estômago e desenquistam no intestino delgado, dando origem a dois trofozoítos que se multiplicam por reprodução assexuada (divisão binária). Os trofozoítos aderem ao epitélio intestinal do duodeno e das primeiras porções do jejuno colonizando o intestino delgado. Contudo, o parasita não permanece sempre aderente, destacando-se das células epiteliais ao longo do ciclo replicativo sendo arrastado até ao intestino grosso onde enquista. Após um período de 5 a 7 dias da infeção, podem ser encontrados nas fezes quistos e trofozoítos, mas só os quistos é que resistem às condições a que ficam expostos no meio ambiente (Adam, 2000; Monis e Thompson, 2003). Podem ser eliminados nas fezes cerca de 2.000.000 de quistos por grama de fezes, contaminando assim o ambiente (Smith *et al.*, 2006).

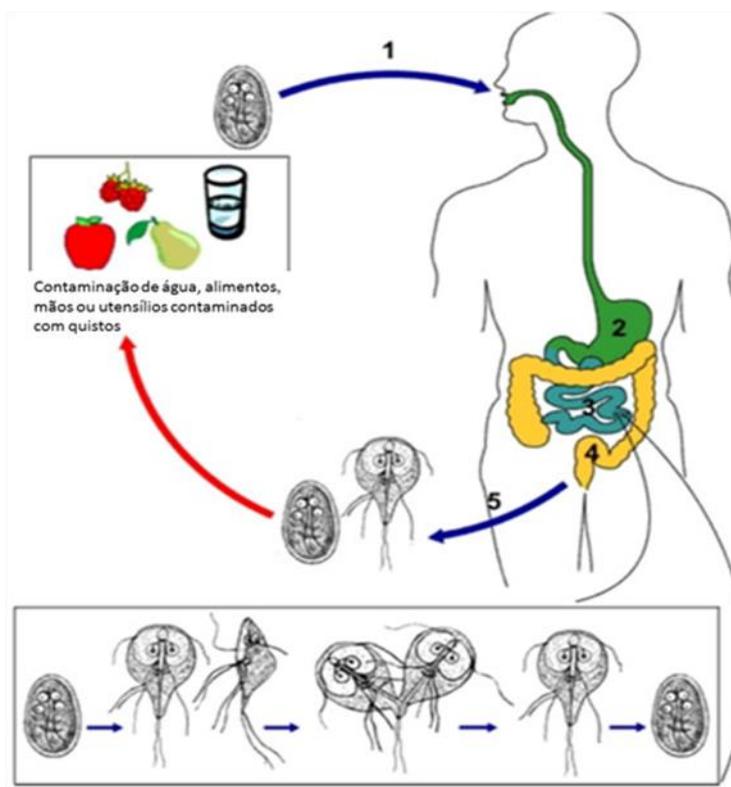


Figura 2. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. 1 - Ingestão de quistos através de água e alimentos contaminados ou mãos e utensílios/superfícies; 2 - O quisto é exposto ao ambiente ácido do estômago; 3 - São libertados dois trofozoítos no intestino delgado, onde ocorre a reprodução assexuada; 4 - Os trofozoítos transformam-se em quistos e saem nas fezes 5 - Eliminação das formas parasitárias nas fezes (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC) <http://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>).

Os quistos são muito resistentes aos tratamentos de cloro e de filtração, podendo ser transmitidos através da água tratada (Kelley, et al. 1984). A dose infecciosa de *Giardia* sp. é muito baixa, cerca de 10 a 100 quistos são suficientes para provocar infecção (Adam, 2001; Dawson, 2005).

Têm havido surtos de giardiase de origem hídrica por todo o mundo, mas nos países em desenvolvimento que têm deficientes condições higiênicas e sanitárias, com muitos problemas relativos à qualidade da água, têm sido mais frequentes (Espelage et al., 2010). Na Alemanha, em 2007, foram notificados 3.651 casos de giardiase ao Instituto Robert Koch. Na maioria dos casos (62%) foi reportado que a infecção tinha sido adquirida na Alemanha, sendo que a fonte de contaminação e os fatores de risco não foram identificados (Espelage et al., 2010). Nos países desenvolvidos, são conhecidos surtos associados à ingestão de água contaminada e à utilização de piscinas e afins (Espelage et al., 2010).

Menos frequentemente têm sido relatados surtos de giardíase devido ao consumo de alimentos contaminados (Espelage *et al.*, 2010). Um estudo no Reino Unido associou à transmissão de giardíase a ingestão de água contaminada (de piscinas, água de consumo) e ingestão de saladas contaminadas (Espelage *et al.*, 2010).

A giardíase é a infecção do intestino delgado provocada por *G. lamblia* que pode ser assintomática ou sintomática. As infecções sintomáticas podem ter uma fase aguda, em que o indivíduo sente náuseas, fadiga, diarreia aquosa, desconforto intestinal, distensão abdominal e flatulência, que normalmente tem a duração de alguns dias (Ankarklev *et al.*, 2010). A fase crónica da infecção, provoca má absorção de nutrientes, nomeadamente lípidos e vitaminas, perda de peso e diarreia intermitente. Os sintomas da giardíase podem aparecer 6-15 dias após a infecção e o impacto clínico é maior em crianças pequenas e em indivíduos desnutridos ou imunodeficientes. Segundo alguns autores, o quadro clínico da giardíase depende de vários fatores como o número de quistos ingeridos, a idade do hospedeiro e o seu estado imunológico e nutricional (Faubert, 2000; Scott *et al.*, 2002; Sahagun *et al.*, 2008).

Os indivíduos assintomáticos são considerados reservatórios importantes da giardíase, contribuindo para a sua disseminação (Savioli *et al.*, 2006).

1.5. *Cryptosporidium*

Cryptosporidium sp. é um protozoário que pertence ao Filo Apicomplexa e à subclasse *Coccidia*. É responsável por infecções em vários hospedeiros, provocando doenças gastrointestinais (Araújo, 2015). O parasita é transmitido pela via fecal-oral, através do contacto direto entre homem-homem e homem-animal ou indiretamente através da ingestão de água ou alimentos contaminados (Rehn *et al.*, 2015). Constitui um elevado risco para a saúde pública, especialmente para as crianças e indivíduos imunocompetentes (Araújo, 2015).

Atualmente estão descritas cerca de 26 espécies e 40 genótipos diferentes do género *Cryptosporidium*. Algumas dessas espécies estão reconhecidas como responsáveis por causar infecções no Homem, as criptosporidioses (Araújo, 2015). Segundo Pérez-Cordón *et al.* (2016) e Rehn *et al.* (2015), entre as 26 espécies descritas, *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum* são as espécies mais comuns que infetam o homem e também uma grande variedade de animais (Tabela 9).

Tabela 9. Exemplos de espécies de *Cryptosporidium* e seus respectivos hospedeiros (Adaptado de Chalmers e Katzer, 2013 e de Plutzer e Karanis, 2009).

Espécies de <i>Cryptosporidium</i>	Hospedeiros	
	Principais	Ocasionais
<i>C. muris</i>	Roedores	Ungulados, primatas incluindo o homem, cão, gato e mamíferos marinhos
<i>C. andersoni</i>	Bovinos	Homem, outros ungulados incluindo ungulados selvagens e roedores
<i>C. parvum</i>	Ruminantes e homem	Cão, outros ungulados e roedores
<i>C. hominis</i>	Primatas incluindo o homem	Roedores, ruminantes e mamíferos marinhos
<i>C. canis</i>	Cão	Homem e bovinos
<i>C. felis</i>	Gato	Homem e bovinos
<i>C. suis</i>	Suínos	Homem e bovinos
<i>C. cuniculus</i>	Coelho, homem	N.A.
<i>C. scrofarum</i>	Suínos	Homem
<i>C. tyzzeri</i>	Roedores	Homem
<i>C. ubiquitium</i>	Caprinos	Homem, roedores e mamíferos selvagens
<i>C. viatorum</i>	Homem	N.A.
<i>C. meleagridis</i>	Perús	Outras aves, homem, cão e roedores

Cryptosporidium sp. é um parasita intracelular obrigatório e tem um ciclo de vida monoxeno, (Fig. 3). A forma infetante são os ooquistos esporulados, que contêm 4 esporozoítos, resultantes de um processo de maturação no meio exterior após a sua eliminação nas fezes do homem e de animais. O homem contamina-se através da ingestão de água e alimentos contaminados ou eventualmente por inalação de ooquistos esporulados. Os esporozoítos são libertados no intestino e vão parasitar as células epiteliais do trato gastrointestinal. No interior das células desencadeia-se a reprodução assexuada, denominada esquizogonia ou merogonia, responsável pela formação de merozoítos que vão invadir novas células. Paralelamente a este ciclo assexuado, ocorre a reprodução sexuada, gametogonia, produzindo os microgametócitos e macrogametócitos. O macrogametócito diferencia-se em gâmeta feminino (macrogâmeta) e o microgametócito em gâmetas masculinos (microgâmetas) e ocorre a fecundação com a formação do ovo ou zigoto. Após este processo desenvolvem-se dois tipos de ooquistos, os ooquistos com parede celular espessa, que são libertados nas fezes do hospedeiro, e os ooquistos de parede celular fina, que permanecem no hospedeiro e são responsáveis pelas auto-infeções (CDC, 2015a).

A dose infecciosa de *Cryptosporidium* sp. é muito baixa, entre 10 a 30 ooquistos (Shields *et al.*, 2012). Estudos clínicos indicam que apenas 1 ooquisto é suficiente para provocar infecção num indivíduo (Souza *et al.*, 2010) e um estudo mais recente demonstrou que a dose ≤ 10 ooquistos é suficiente para provocar infecção em indivíduos saudáveis (Araújo, 2015).

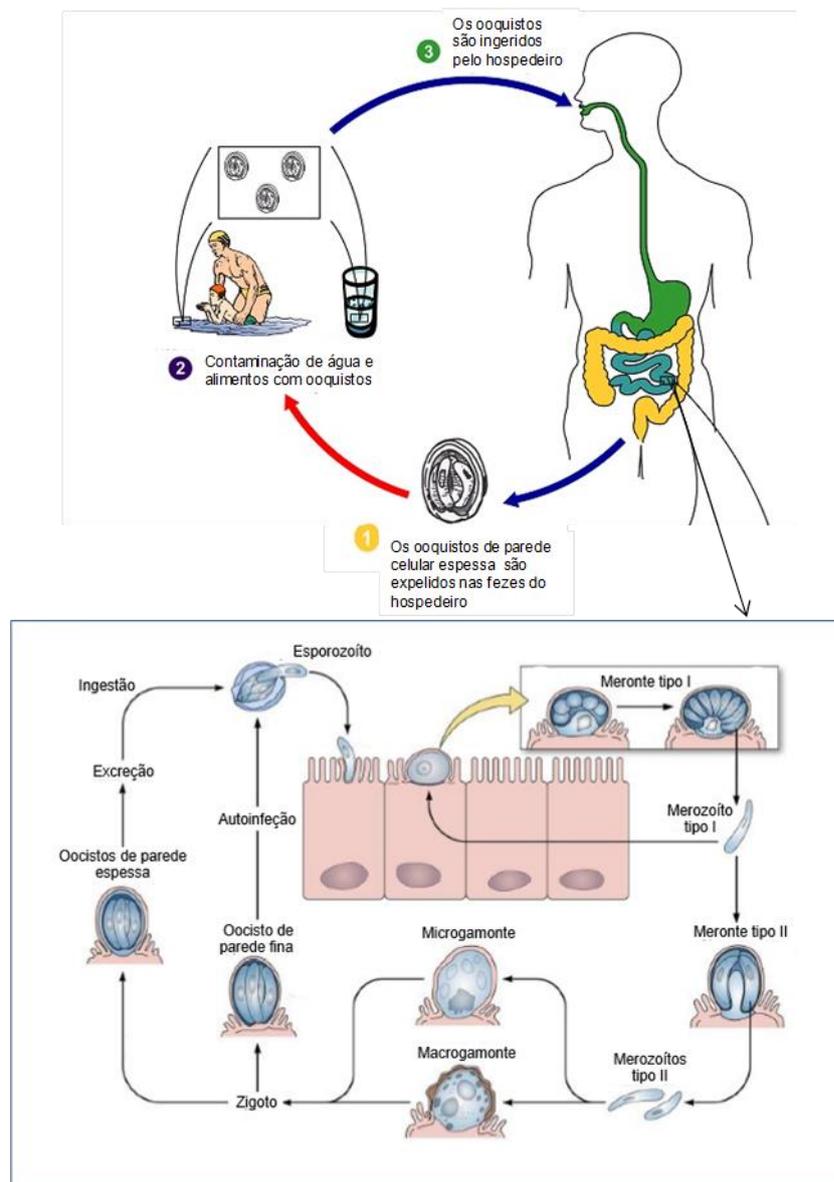


Figura 3. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* sp. (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC) <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/pathogen.html> e de Bouzid *et al.*, 2013).

A parede celular do ooquistos que é expelido nas fezes confere-lhe resistência às condições ambientais e aos danos físicos e químicos, conferindo-lhe impermeabilidade a produtos químicos de desinfecção, nomeadamente, o cloro utilizado no tratamento da água (Souza *et al.*, 2010). Os ooquistos podem ser veiculados pela água, contaminando os solos e posteriormente os alimentos (Shields *et al.*, 2012).

Têm sido relatados muitos surtos de origem hídrica de criptosporidiose, em todo o mundo (Tabela 10) (Rehn *et al.*, 2015). O maior surto ocorreu em Milwaukee, nos Estados Unidos da América, em 1993, em que 403.000 pessoas foram afetadas devido à contaminação da água de abastecimento público com ooquistos de *Cryptosporidium* sp. (Franco, 2007).

A criptosporidiose é uma das doenças de notificação obrigatória, em alguns países, como é o caso da Suécia, onde, têm sido reportados anualmente uma média de 45 casos de surtos de criptosporidiose, adquiridos em ambiente doméstico (Rehn *et al.*, 2015).

Tabela 10. Exemplos de surtos de origem hídrica provocados por *Cryptosporidium* (Franco, 2007).

País/zona	Ano	Pessoas afetadas	Origem
EUA (Texas)	1984	79 pessoas	Água do poço
EUA (Georgia)	1987	13 000 pessoas	Água tratada e não tratada
EUA (Oregon)	1993	15 000 pessoas	Água em processo de tratamento
EUA (Milwaukee e Winconsin)	1993	403 000 pessoas	Água tratada, gelo
Japão (Saitama)	1996	8 705 pessoas	Água tratada e não tratada

A criptosporidiose é uma doença diarreica a nível mundial (Pérez-Cordón *et al.*, 2016) que pode provocar, para além de diarreia aquosa, náuseas, dores de estômago, desidratação, vômitos, perda de peso e febre (Reh *et al.*, 2015). Normalmente, estes sintomas aparecem cerca de 2 a 10 dias após a infeção dos hospedeiros. Podem durar cerca de 1 a 2 semanas, contudo, existem casos em que a infeção é resolvida em alguns dias e outros em que os sintomas prevalecem durante quatro ou mais semanas. Recentemente, foi relatado a presença de sintomas gastrointestinais durante três anos (Rehn *et al.*, 2015).

O risco de desenvolver doença crónica e grave depende do estado de saúde do indivíduo (CDC, 2015b). Os indivíduos com sistema imunitário debilitado desenvolvem criptosporidiose grave e crónica, podendo levar à morte. Indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), doenças hereditárias que afetam o sistema imunitário, cancro ou que tomem medicamentos imunossupressores (por exemplo em caso de transplante) são considerados grupos de risco para a criptosporidiose (CDC, 2015b).

A criptosporidiose ocorre em todo o mundo, afetando todos os grupos etários, mas as crianças são frequentemente mais afetadas e com consequências muito graves para a sua saúde (Rehn *et al.*, 2015).

Considerando o impacto na saúde pública da giardíase e criptosporidiose, que os agentes etiológicos destas doenças são maioritariamente veiculadas por água e alimentos e que não existem trabalhos descritos sobre *Giardia* e *Cryptosporidium* em alimentos em Portugal, propõe-se no presente trabalho pesquisar a presença destes parasitas em saladas pré-embaladas de forma a avaliar o risco associado ao consumo deste tipo de alimentos.

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos

Este estudo teve como objetivo detetar e caracterizar os protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* sp. em saladas pré-embaladas e prontas para consumo de forma a avaliar o risco para a saúde pública associado ao consumo deste produto alimentar.

Tendo em vista o objetivo principal, um plano de trabalho foi elaborado com os seguintes objetivos:

- Deteção de *G. lamblia* em saladas pré-embaladas por técnicas de biologia molecular, qPCR e nested-PCR;
- Deteção de *Cryptosporidium* sp. em saladas pré-embaladas por técnicas de biologia molecular, qPCR e nested-PCR;
- Determinação da sensibilidade das técnicas de qPCR e nested-PCR;
- Caracterização das espécies/genótipos de *G. lamblia* por sequenciação do ADN;
- Caracterização das espécies/genótipos de *Cryptosporidium* por sequenciação do ADN.

Capítulo 3

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Caracterização e processamento das amostras

As amostras de saladas foram adquiridas durante o período de junho a setembro de 2015 em hipermercados de duas grandes cadeias, situados na cidade de Coimbra. As saladas selecionadas foram as pré-embaladas, prontas para consumo, de três marcas diferentes e de vegetais variados (alface verde, roxa e frisada, rúcula, canónigos, agrião, *radicchio*) (Tabela II). As saladas foram obtidas, pelo menos duas vezes em cada mês das colheitas, totalizando-se vinte e quatro amostras.

Tabela II. Identificação e características das amostras de saladas.

Data de aquisição	Amostra (código)	Lote	Data de validade	Composição
26/06/2015	Aa1	52611	29/06/2015	Alface frisada
	Va1	L-5525	28/06/2015	Alface verde e roxa
	Fa1	C-1-2G:43	29/06/2015	Escarola frisada, escarola lisa, <i>radicchio</i>
30/06/2015	Fm1	C-1-3C:55	04/07/2015	Alface roxababy, canónigos, rúcula e agrião
	Vm1	L-5526	05/07/2015	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem
14/07/2015	Am1	CI-2G:07	21/07/2015	Escarola lisa, escarola frisada, <i>radicchio</i>
	As1	CI-2G:40	16/07/2015	Rebentos de alface, rebentos de alface vermelha e rúcula
	FG1	CI-2N:17	18/07/2015	Escarola frisada, <i>radicchio</i> , rúcula
	VG1	L-5328	16/07/2015	Escarola, <i>radicchio</i> , canónigos
22/07/2015	Aa2	52952	24/07/2015	Alface frisada
	AG1	CI-1B:11	26/07/2015	Escarola frisada, <i>radicchio</i> , canónigos
	Fa2	CI-1F:53	26/07/2015	Escarola frisada, <i>radicchio</i> , escarola lisa
	Vm2	L-5529	26/07/2015	Alface verde, alface roxa e rúcula
05/08/2015	Va2	L-5631	10/08/2015	Alface verde e alface roxa
	Fm2	CI-3B:34	10/08/2015	Alface roxa baby, canónigos, rúcula e agrião
	Am2	CI-1H:36	10/08/2015	Escarola lisa, escarola frisada, <i>radicchio</i>

	VG2	L-5237	16/09/2015	Escarola, <i>radicchio</i> , canónigos
	FG2	C1-1E:46	18/09/2015	Escarola frisada, <i>radicchio</i> , rúcula e canónigos
15/09/2015	AS2	C1-4J:08	17/09/2015	Rebentos de alface, rebentos de alface vermelha e rúcula
	AG2	C1-2C:20	19/09/2016	Escarola frisada, <i>radicchio</i> , canónigos
	Vp1	L-5338	25/09/2015	Canónigos, alface roxa, escarola e cebolinho
24/09/2015	Fant.1	02162119 C:04	26/09/2015	Alface roxa, canónigos, rúcula, agrião
	Vp2	L- 5139	29/09/2015	Canónigos, alface roxa, escarola e cebolinho
28/09/2015	Fant.2	02166674 C:09	29/09/2015	Alface roxa, canónigos, rúcula, agrião

O processamento das amostras foi realizado imediatamente após a compra das saladas, em condições de assepsia. Uma porção de cada salada (25 gramas) foi colocada em um saco de plástico *stomacher* (vidrolab2) ao qual se adicionou 200 ml de solução salina estéril (0,85% NaCl). A mistura foi agitada na incubadora vertical (Model G25, New Brunswick Scientific Co. Inc.) durante 15 minutos a 120 rpm. Após agitação, o conteúdo do saco foi filtrado através de duas camadas de gaze em coadores estéreis e o líquido foi transferido para quatro tubos cónicos de 50 ml (falcon). O volume do filtrado foi ajustado com solução salina e centrifugou-se a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C (centrífuga Sigma 3-18K). O sobrenadante foi rejeitado e a centrifugação foi repetida após ressuspensão do sedimento em salino. Posteriormente, os sedimentos dos quatro tubos foram transferidos para um tubo de microcentrífuga (1,5 ml) e centrifugados a 10,000 x g durante 10 minutos. No final, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 500 µL de solução salina e armazenados a 4°C até a extração do ADN total (Dixon *et al.*, 2012).

3.2. Extração de ADN

O ADN total foi extraído do sedimento da amostra utilizando-se o *kit* comercial *QIAamp DNA Stool mini kit* (Qiagen) (Fig. 4). Ao sedimento adicionou-se 0,2 g de pérolas de vidro (0,5 mm; BioSpec Products, Inc.); 1,4 ml do tampão ASL e 170 µL de uma solução de polivinilpirrolidona (10%). A mistura foi agitada no vortex por 3 minutos e incubada a 95°C

durante 1 hora. Após a incubação, as amostras foram agitadas durante 15 segundos e em seguida centrifugadas a 13.000 rpm durante 20 segundos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga, submetido a nova centrifugação a 13.000 rpm durante 3 minutos. Em um novo tubo de microcentrífuga foi adicionado, na seguinte ordem, 15 μ L de solução de proteinase K, 200 μ L do sobrenadante e 200 μ L do tampão AL. Homogeneizou-se o microtubo no vortex durante 15 segundos e incubou-se a 70°C durante 10 minutos. Posteriormente, 350 μ L de etanol absoluto foi adicionado ao lisado, homogeneizou-se no vortex e centrifugou-se rapidamente para remover as gotas retidas na tampa.

O lisado foi transferido para uma coluna *QIAamp spin collum*, previamente introduzida num tubo coletor e centrifugado a 14.000 rpm por um minuto. O tubo coletor contendo o filtrado foi descartado e a coluna foi colocada em um novo tubo coletor. Adicionou-se à coluna 500 μ L do tampão AW1 e centrifugou-se a 14.000 rpm durante 1 minuto. Novamente foi efetuada a troca da coluna para novo tubo coletor, adicionou-se 500 μ L do tampão AW2 e centrifugou-se a 14.000 rpm durante 3 minutos.

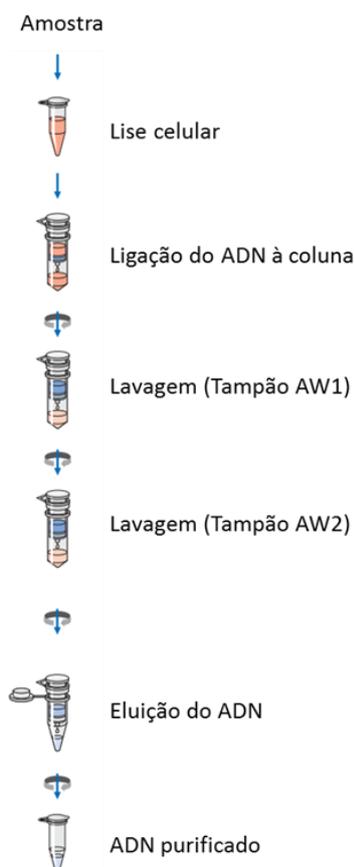


Figura 4. Esquema geral do procedimentos de extração de ADN (Adaptado de *Handbook: Quiagen*, 2010).

Finalmente, a coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga e foi adicionado 200 µL do tampão AE diretamente sobre a membrana. A coluna foi incubada à temperatura ambiente por um minuto e subsequentemente centrifugada a 14.000 rpm por um minuto para a eluição do ADN. A coluna foi descartada e o ADN purificado foi armazenado a -20°C.

3.3. PCR quantitativo em tempo real

3.3.1. *Giardia lamblia*

O ADN extraído foi analisado pelo PCR quantitativo em tempo real (qPCR) utilizando os genes glutamato desidrogenase (*gdh*) e quadro de leitura aberta C4 (*orfC4*), como descrito previamente (Almeida *et al.*, 2010). A utilização de oligonucleotídeos específicos dos genótipos A e B permite detectar e genotipar os isolados de *G. lamblia*.

A amplificação do fragmento de 180pb do gene *gdh*, específico do genótipo A, foi realizada com os oligonucleotídeos *gdhA_F* e *gdhA_R* e apresenta um *meltingpeak* de 83°C (Tabela 12). A amplificação do fragmento de 133pb do gene *gdh*, específico do genótipo B, foi realizada com os oligonucleotídeos *gdhB_F* e *gdhB_R* e apresenta um *meltingpeak* de 83°C (Tabela 12).

Tabela 12. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para amplificação de fragmentos dos genes *gdh* e *orfC4* de *G. lamblia* e do gene *18S rDNA* de *Cryptosporidium* sp.

Genes	Oligonucleotídeos	Sequências (5'-3')	Fragmentos (pb)	Melting peak (°C)	Referências
<i>gdh</i>	<i>gdhA_F</i>	CCGGCAACGTTGCCAGTTT	180	83	Almeida <i>et al.</i> , 2010
	<i>gdhA_R</i>	ACTTGTCTTGAAGCTCGGA			
	<i>gdhB_F</i>	CGTATTGGCGTCGGCGGT	133	83	
	<i>gdhB_R</i>	TGTGGCCTCTGGTCTGATAG			
<i>orfC4</i>	<i>orfC4A_F</i>	CTGTAGACAGGGCCCAGGCC	103	85	
	<i>orfC4A_R</i>	ATGATGTCCCCTGCCCTTAAT			
	<i>orfC4B_F</i>	ACTGTCCATTCTATCTGAG	171	79	
	<i>orfC4B_R</i>	GGATTCCATTGGCCTCCACCT			
<i>18S rDNA</i>	Crypto F	AGTGACAAGAAATAACAATACAGG	315	82	Lalonde e Gajadhar, 2011
	Crypto R	CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC			

Em relação ao gene *orfC4*, utilizaram-se os oligonucleotídeos *orfC4A_F* e *orfC4A* na amplificação do fragmento específico do genótipo A (103pb; *melting peak* de 85°C) e os oligonucleotídeos *orfC4B_F* e *orfC4B_R* na amplificação do fragmento específico do genótipo B (171pb; *melting peak* de 79°C) (Tabela 12).

As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 25 µl, contendo 12,5 µL de *SsoFast EvaGreen Supermix* (Bio-Rad Laboratories), 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM), 1 µL do ADN extraído e 9,5 µL de água estéril (Tabela 13). O qPCR foi realizado no termociclador *CFX96 Real-Time System C1000* (Bio-Rad Laboratories) e os resultados foram analisados através do programa *Bio-Rad CFX Manager* (Bio-Rad Laboratories). As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 98°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 59°C durante 5 segundos. Para obtenção da curva de *melting*, no final de cada reação houve um incremento da temperatura de 5°C a cada 5 segundos até alcançar os 95°C, adquirindo-se um sinal de fluorescência em cada aumento de temperatura.

As reações foram realizadas em duplicado e foram incluídos controlos em conjunto com as amostras em estudo: controlos positivos (genótipo A: WBC6; genótipo B: Ad-28, INI 10 e INI 27), negativos (água) e controlos internos (ADN de salada com ADN de *G. lamblia* WBC6 e *G. lamblia* Ad-28, INI 10 e INI 27). A estirpe de referência WBC6 foi adquirida à American Type Culture Collection (Rockville, MD), o ADN do clone Ad-28 foi cedido pelo Dr. Peter Ey do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade de Adelaide, Austrália, e o ADN dos isolados INI 10 e INI 27 foram cedidos por INI/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil (Faria *et al.*, 2016).

Tabela 13. Composição da solução utilizada na reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) na detecção de *G. lamblia* e *Cryptosporidium* sp.

Reagentes	Volume (µl)	
	<i>G. lamblia</i>	<i>Cryptosporidium</i> sp.
ADN (amostra)	1	2
<i>EvaGreenSupermix</i>	12,5	12,5
Oligonucleotídeo senso (10 µM)	1	1
Oligonucleotídeo antisenso (10 µM)	1	1
Água MiliQ estéril	9,5	8,5
Volume final	25	25

3.3.2. *Cryptosporidium* sp.

O ADN extraído foi analisado pelo qPCR utilizando o gene 18S rDNA, como descrito previamente (Lalonde e Gajadhar, 2010). A amplificação do fragmento de 315pb do gene 18S rDNA foi realizada com os oligonucleotídeos Crypto F e CryptoR e apresenta um *melting peak* de 82°C (Tabela 12).

As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 25 µl, contendo 12,5 µL de *SsoFast EvaGreen Supermix* (Bio-Rad Laboratories), 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM), 2 µL do ADN extraído e 8,5 µL de água estéril (Tabela 13). O qPCR foi realizado no termociclador *CFX96 Real-Time System C1000* (Bio-Rad Laboratories) e os resultados foram analisados através do programa *Bio-Rad CFX Manager* (Bio-Rad Laboratories). As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 55°C durante 30 segundos. Para obtenção da curva de *melting*, no final de cada reação houve um incremento da temperatura de 5°C a cada 5 segundos até alcançar os 95°C, adquirindo-se um sinal de fluorescência em cada aumento de temperatura.

As reações de amplificação foram realizadas em duplicado e foram incluídos controlos em conjunto com as amostras em estudo: controlos positivos (ADN de *Cryptosporidium* sp.), negativos (água) e controlos internos (ADN de salada com ADN de *Cryptosporidium* sp.). O ADN de *Cryptosporidium* de referência (INI Crypto) foi extraído de uma amostra de ooquistos enviada pela INI/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

3.4. Nested-PCR

3.4.1. *Giardia lamblia*

O ADN extraído foi também analisado por nested-PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos do gene da subunidade menor do ARN ribossomal (*ssu rRNA*) de *G. lamblia*. A primeira reação de amplificação foi realizada com o par de oligonucleotídeos Gia2029 e Gia2150c e a segunda reação com os oligonucleotídeos RH11 e RH4 (Tabela 14), previamente descritos por Appelbee *et al.* (2003) e Hopkins *et al.* (1997). A primeira reação produziu um fragmento com 497pb e a segunda um fragmento de 292pb.

Tabela 14. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados no nested-PCR para amplificação de fragmentos do gene *ssu rRNA* de *Giardia lamblia* e do gene *ssu rRNA* de *Cryptosporidium* sp.

Genes	Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')	Fragmentos (pb)	Refêrencias
<i>ssu rRNA</i>	Gia2029	AAGTGTGGTGCAGACGGACTC	497	Appelbee et al., 2003
	Gia2150c	CTGCTGCCGTCCTTGGATGT		
	RH11	CATCCGGTTCGATCCTGCC	292	Hopkins et al., 1997
	RH4	AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG		
<i>ssu rRNA</i>	Crypto18SF1	TTCTAGAGCTAATACATGCG	1325	Xiao et al., 1999
	Crypto18SR1	CCCTAATCCTTCGAAACAGGA		
	Crypto18SF2	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	825	
	Crypto18SR2	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA		

As duas reações de amplificação (1ª e 2ª reação) foram realizadas para um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de *Kapa Read Mix* (Kapa Biosystems), 1,25 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM), 1,25 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,5 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂), 5 µL do ADN extraído (1ª reação) ou 1 µL do produto amplificado na primeira reação de nested-PCR (2ª reação) e água estéril MiliQ de modo a perfazer o volume final (Tabela 15). As amplificações foram realizadas em um termociclador (Biometra Tpersonal). Para a reação de amplificação primária usou-se um ciclo de desnaturação inicial de 96°C durante 4 minutos; 35 ciclos de amplificação a 96°C durante 45 segundos, 55°C durante 30 segundos e 72°C durante 45 segundos; seguidos de um ciclo final de 4 minutos a 72°C. Na segunda reação de amplificação utilizaram-se as mesmas condições de amplificação mas a temperatura de anelamento foi de 59°C.

As reações de amplificação foram realizadas em duplicado e foram incluídos controlos em conjunto com as amostras em estudo: controlos positivos (ADN de *G. lamblia* WBC6), negativos (água) e controlos internos (ADN de salada com ADN de *G. lamblia* WBC6).

Tabela 15. Composição da solução utilizada na reacção de nested-PCR para *G. lamblia* e *Cryptosporidium* sp.

Reagentes	Quantidades (µl)			
	<i>Giardia lamblia</i>		<i>Cryptosporidium</i> sp.	
	1ª Reacção	2ª Reacção	1ª Reacção	2ª Reacção
ADN (amostra)	5	1	5	1
<i>Kapa Ready Mix</i>	12,5	12,5	10	10
Oligonucleotídeo senso (10 µM)	1,25	1,25	1	1
Oligonucleotídeoantisenso (10 µM)	1,25	1,25	1	1
DMSO	1,25	1,25	-	-
MgCl ₂	0,5	0,5	-	-
BSA	-	-	3	3
Água	3,25	7,25	-	4
Volume final	25	25	20	20

3.4.2. *Cryptosporidium* sp.

O ADN extraído foi também analisado por nested-PCR utilizando-se oligonucleótidos para o gene da subunidade menor 18S do RNA ribossomal (*ssu rRNA*). A primeira reacção de amplificação foi realizada com o par de oligonucleotídeos Crypto 18SF1 e Crypto 18SR1 e a segunda reacção com os oligonucleotídeos Crypto 18SF2 e Crypto 18SR2 (Tabela 14), previamente descritos por Xiao *et al.* (1999). A primeira reacção produziu um fragmento de 1325pb e a segunda um fragmento de 825pb.

As duas reacções de amplificação (1ª e 2ª reacção) foram realizadas para um volume final de 20 µL, contendo 10 µL de *Kapa ReadMix* (Kapa Biosystems), 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM), 3µL de albumina de soro bovino (BSA), 5 µL do ADN extraído (1ª reacção) ou 1 µL do produto amplificado na primeira reacção de PCR (2ª reacção) e água estéril MiliQ de modo a perfazer o volume final (Tabela 15). As amplificações foram realizadas num termociclador (Biometra Tpersonal). Para a reacção de amplificação primária usou-se um ciclo de desnaturação inicial de 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos de amplificação a 94°C durante 45 segundos, 59°C durante 45 segundos e 72°C durante 60 segundos; seguidos de um ciclo final de 7 minutos a 72°C.

Na segunda reação de amplificação usou-se um ciclo de desnaturação inicial de 94°C durante 3 minutos; 40 ciclos de amplificação a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 90 segundos e 72°C durante 1 minuto; seguidos de um ciclo final de 7 minutos a 72°C.

As reações de amplificação foram realizadas em duplicado e foram incluídos controlos em conjunto com as amostras em estudo: controlos positivos (ADN de *Cryptosporidium* sp.), negativos (água) e controlos internos (ADN de salada com ADN de *Cryptosporidium* sp.).

3.5. Sequenciação

Os produtos de amplificação resultantes da segunda reação de nested-PCR e do qPCR foram purificados utilizando o *kit QIAquick PCR Purification* (Qiagen), segundo as instruções do fabricante. Subsequentemente, o ADN purificado foi quantificado (ND 1000, Nanodrop) e as cadeias de ADN foram sequenciadas em ambos os sentidos pelo método dos terminadores de cadeia automatizado (Sanger *et al.*, 1977), utilizando o *kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) e o sequenciador automático *ABI Prism 3730 xL* (Applied Biosystems).

As sequências nucleotídicas obtidas (senso e antisenso) de cada amostra foram analisadas e alinhadas com o auxílio dos programas *BioEdit* (<http://www.clcbio.com>) e *MEGA* versão 6 (<http://www.megasoftware.net>), respectivamente. O programa *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi utilizado para comparar as sequências nucleotídicas finais com as sequências de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. disponíveis no *GenBank*.

3.6. Determinação do limite de deteção de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* sp. no qPCR e nested-PCR

A sensibilidade das técnicas de qPCR e nested-PCR foi determinada recorrendo-se ao ADN genómico de um controlo positivo de *G. lamblia* e de *Cryptosporidium* sp.

3.6.1. *Giardia lamblia*

O ADN genómico de *G. lamblia* foi extraído a partir de uma cultura em fase exponencial tardia de trofozoítos (WBC6) utilizando-se o *kit Prep-A-Gene DNA purification*

(Biorad) (Sousa, 2002). Procedeu-se à quantificação do ADN da amostra (ND 1000, Nanodrop) e de seguida efetuaram-se várias diluições (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000, 1:1.000.000 e 1:10.000.000) de forma a obter uma gama crescente de concentrações de ADN. A reação de nested-PCR foi realizada como descrita anteriormente.

O limite de deteção da reação qPCR para *G. lamblia* foi anteriormente descrito (Almeida *et al.*, 2010) e corresponde ao ADN de um trofozoíto do parasita.

3.6.2. *Cryptosporidium* sp.

Uma amostra de ooquistos de *Cryptosporidium* sp. (INI Crypto, Anexo I) (10^5 ooquistos) foi sujeita a diluições de 1:10 (10^4 ooquistos), 1:100 (10^3 ooquistos), 1:1.000 (10^2 ooquistos), 1:10.000 (10 ooquistos) e 1:100.000 (1 ooquisto) e efetuou-se a extração do ADN destas amostras diluídas conforme descrito anteriormente para as saladas. Posteriormente, realizaram-se as reações de qPCR e nested-PCR, conforme descrito anteriormente para *Cryptosporidium*.

3.7. Visualização dos fragmentos de ADN amplificados

A observação dos fragmentos de ADN amplificados no qPCR e nested-PCR foi realizada através da electroforese em gel de agarose. Assim, 15 μ L dos produtos amplificados foram misturados com 3 μ L de uma solução aquosa de azul de bromofenol e foram aplicados nos poços do gel de agarose (Nzytech) a 2% tampão Tris base ácido bórico e EDTA (TBE) (p/v) com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) (Plus One, Pharmacia Biotech). Para comprovação do tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado um padrão de ADN apropriado (NzyDNA Ladder VI, Nzytech) na electroforese. As migrações electroforéticas foram realizadas a 100 V durante 90 minutos, em tampão de corrida TBE IX. O gel foi visualizado e fotografado (Uvitec, Uvisave) sobre luz ultravioleta, num transiluminador adequado (Vilbert Lourmat).

Capítulo 4

Resultados

4. Resultados

As amostras de saladas pré-embaladas foram inicialmente sujeitas a uma extração e purificação de ADN e posteriormente procedeu-se à deteção de *G. lamblia* e *Cryptosporidium* sp. através de dois métodos moleculares, o qPCR e o nested-PCR, previamente descritos.

4.1. Deteção de *Giardia lamblia* por qPCR e nested-PCR

O qPCR utilizado para *G. lamblia* é específico dos genótipos A e B que infectam o homem e uma grande variedade de animais permitindo fazer simultaneamente a deteção e a genotipagem dos isolados (Almeida *et al.*, 2010).

Fragmentos de ADN dos genes *gdh* (*melting peak* de 83°C) e *orfC4* (*melting peak* de 85°C) foram amplificados na presença do genótipo A (WBC6) (Fig. 5).

Fragmentos com *melting peak* de 83°C do gene *gdh* e 79°C do gene *orfC4* são amplificados na presença do genótipo B (Ad-28; INI 10 e INI 27) (Fig. 6).

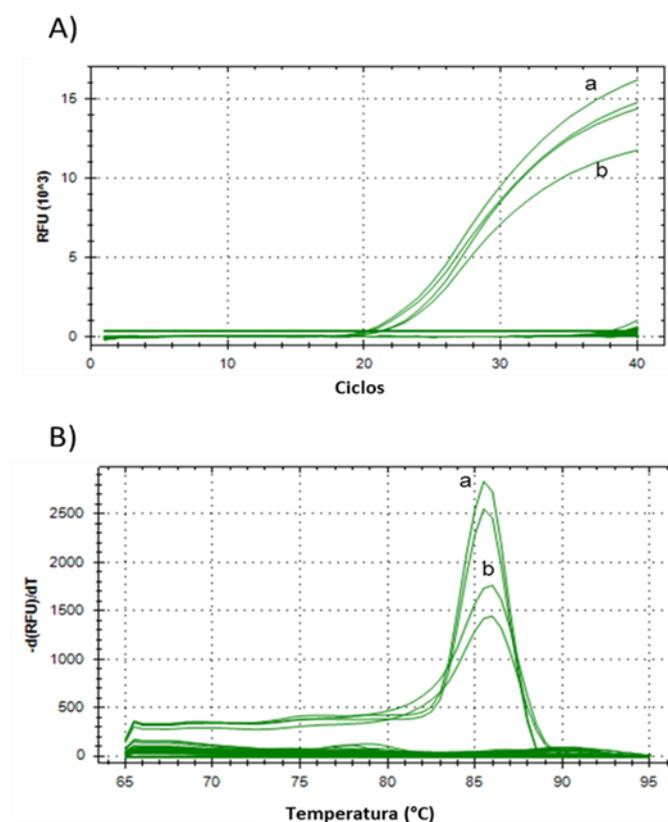


Figura 5. Curvas de amplificação (A) e curvas de *melting* (B) do qPCR dos genes *gdh* (a) e *orfC4* (b) do genótipo A (WBC6) de *Giardia lamblia*.

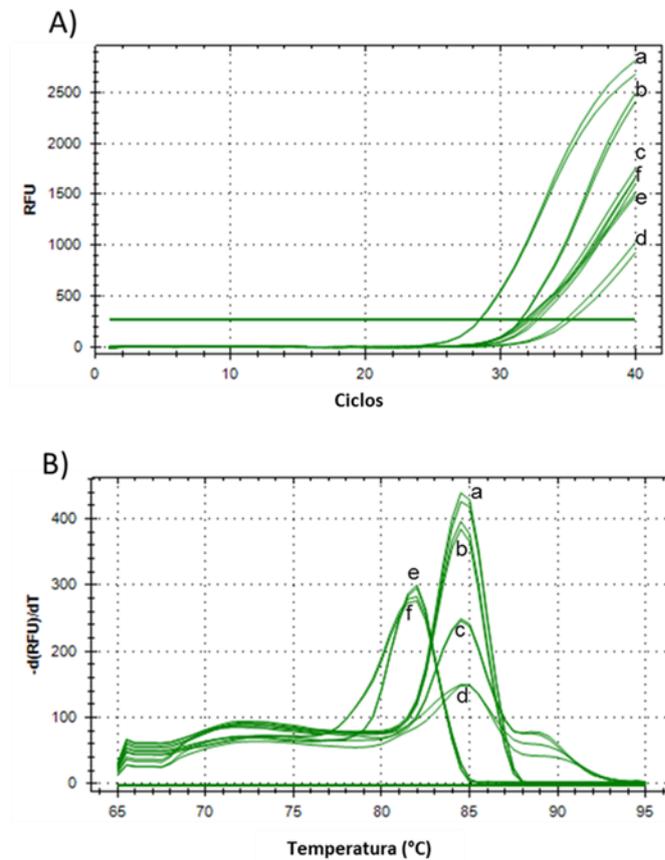


Figura 6. Curvas de amplificação (A) e curvas de *melting* (B) do qPCR dos genes *gdh* (a, b, c, d) e *orfC4* (e, f) do genótipo B de *Giardia lamblia*: a) Ad-28, diluição 1:10; b) Ad-28, diluição 1:100; c) INI 27; d) INI 10; e) INI 27; f) INI 10.

Nas reações de qPCR foi detectada amplificação de ADN do gene *gdh* de *G. lamblia* genótipo A na amostra de salada Fm2 (Fig. 7; Tabela 16). As curvas de amplificação e de *melting* apresentadas na figura 7 são exemplificativas de algumas amostras estudadas.

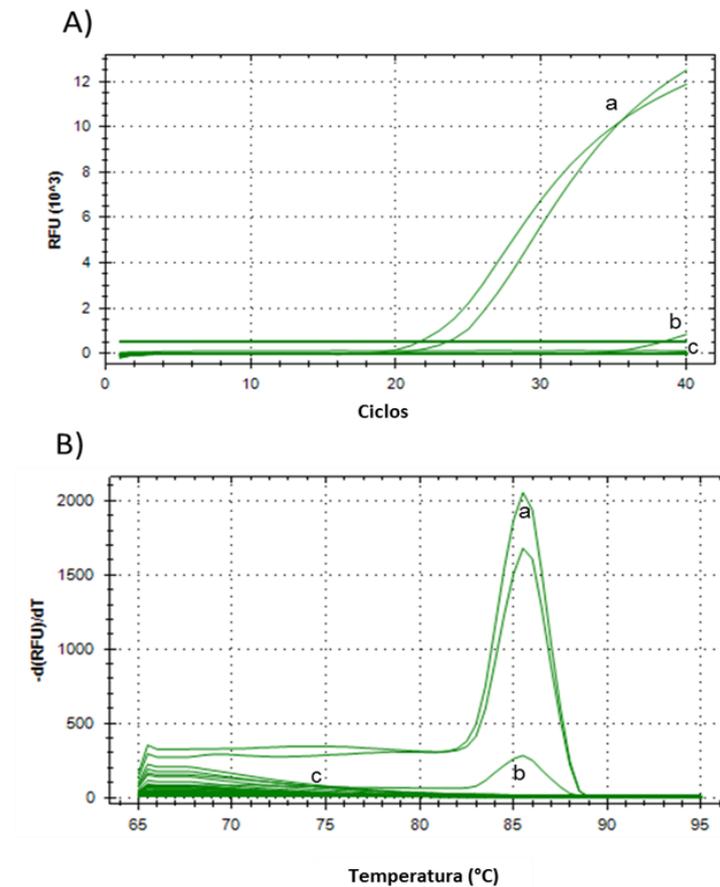


Figura 7. Curvas de amplificação (A) e curvas de *melting* (B) do qPCR do gene *gdh* do genótipo A de *Giardia lamblia* nas amostras de saladas: a) Controlo positivo (WBC6); b) amostra Fm2; c) amostras Va2, Am2, VG2, FG2, AS2, AG2.

O nested-PCR descrito por Appelbee *et al.* (2003) e Hopkins *et al.* (1997) amplificou fragmentos de 292 pb do gene *ssu rRNA* nas amostras controlos de *G. lamblia* (C+, positivo; e Ci, interno) (Fig. 8).

Das 24 amostras de saladas testadas, obteve-se amplificação de ADN de *Giardia lamblia* em uma amostra (Fm2) (4,16%) (Fig. 8).

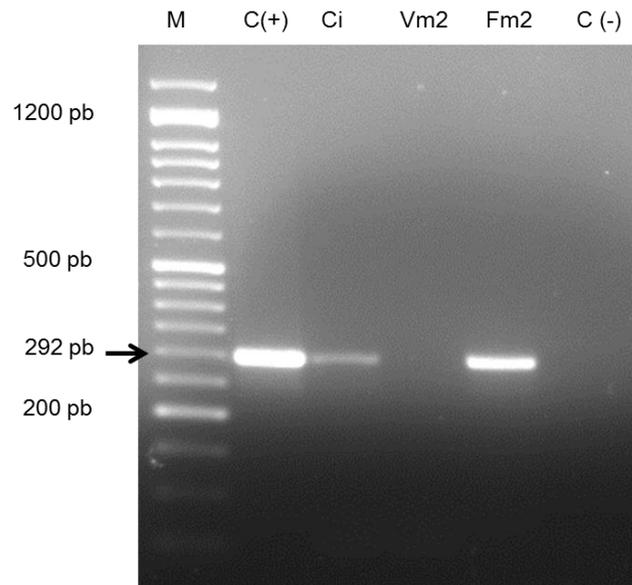


Figura 8. Separação electroforética em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio dos produtos do nested-PCR do gene *ssu rRNA* de *G. lamblia*. Os fragmentos 292pb foram amplificados pelos oligonucleotídeos Gia2029, Gia2150c, RH11 e RH4. M: marcador de massa molecular NzyDNA Ladder VI (Nzytech); C(+): controlo positivo; Ci: controlo interno; Vm2: amostra de salada; Fm2: amostra de salada; C(-): controlo negativo.

Tabela 16. Detecção de *Giardia lamblia* nas saladas por qPCR e nested-PCR.

Data de aquisição (saladas)	Amostra (código)	qPCR				Nested-PCR <i>ssu rRNA</i>
		<i>gdh</i>		<i>orfC4</i>		
		genótipo A	genótipo B	genótipo A	genótipo B	
n.a.	Controlo (WBC6)	+	-	+	-	+
	Controlo (Ad-28)	-	+	-	+	n.a.
	Controlo (INI 10)	-	+	-	+	n.a.
	Controlo (INI 27)	-	+	-	+	n.a.
	Controlo interno	+	+	+	+	+
26-06-2015	Aa1					
	Va1	-	-	-	-	-
	Fa1					
30-06-2015	Fm1					
	Vm1	-	-	-	-	-
14-07-2015	Am1					
	As1					
	FG1	-	-	-	-	-
	FG1					
22-07-2015	Aa2					
	AG1					
	Fa2	-	-	-	-	-
	Vm2					
05-08-2015	Va2	-	-	-	-	-
	Fm2	+	-	-	-	+
	Am2	-	-	-	-	-
15-09-2015	VG2					
	FG2					
	AS2	-	-	-	-	-
	AG2					
24-09-2015	Vp1					
	Fant.1	-	-	-	-	-
28-09-2015	Vp2					
	Fant.2	-	-	-	-	-

*n.a. - não aplicável

4.2. Detecção de *Cryptosporidium* por qPCR e nested-PCR

O qPCR utilizado para a deteção de *Cryptosporidium* sp. foi descrito por Lalonde e Gajadhar (2011). Fragmentos de ADN dos gene *18S rDNA* com *melting peak* de 82°C foram amplificados no controlo positivo e em duas amostras de saladas VmI e VaI (Fig. 9).

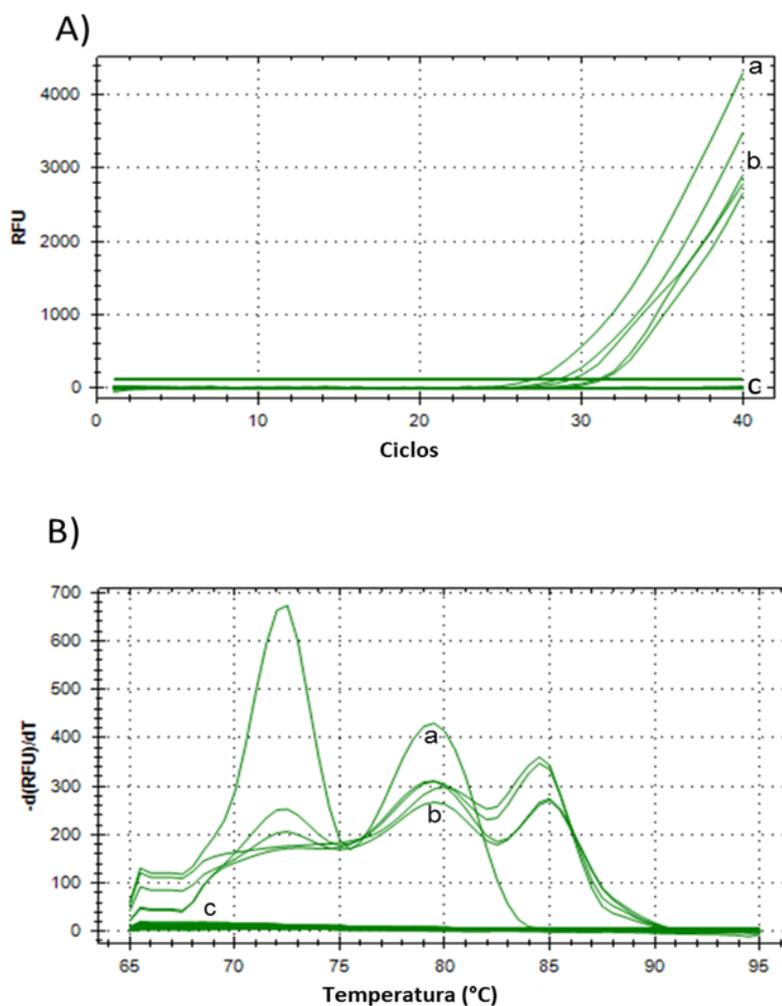


Figura 9. Curvas de amplificação (A) e curvas de *melting* (B) do qPCR do gene *18S rDNA* de *Cryptosporidium* sp.: a) controlo positivo (INI Crypto); b) amostras VmI e VaI; c) amostras AaI, FaI, FmI.

O nested-PCR descrito por Xiao *et al.* (1999) amplificou fragmentos de 825 pb do gene *ssu rRNA* de *Cryptosporidium* sp. nas amostras controlos (C+, positivo; Ci, interno) (Fig. 10).

Nas 24 amostras de saladas em estudo, não se obteve amplificação em nenhuma amostra. Os resultados apresentados na figura 10 são exemplificativos de algumas amostras estudadas.

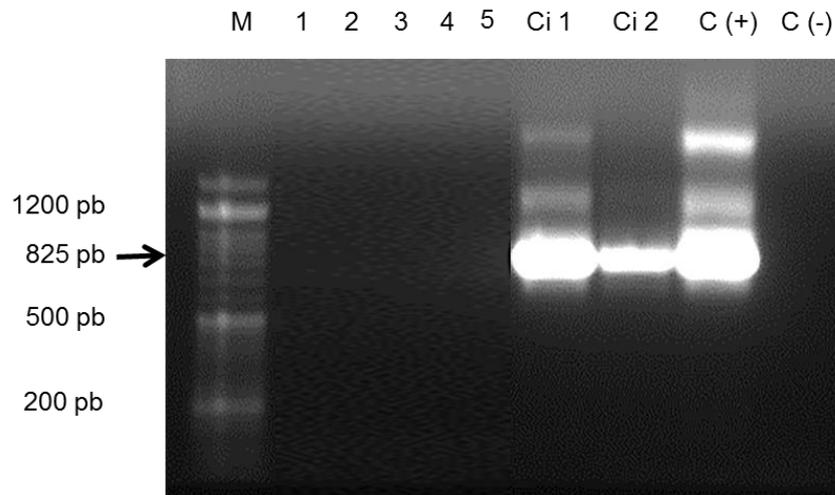


Figura 10. Separação electroforética em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio dos produtos do nested-PCR do gene *ssu rRNA* de *Cryptosporidium* sp.. Os fragmentos 825pb foram amplificados pelos oligonucleotídios Crypto 18SF1, Crypto 18SR1, Crypto 18SF2 e Crypto 18SR2. M: marcador de massa molecular NzyDNA Ladder VI (Nzytech); C(+): controlo positivo (INI Crypto); Ci 1: controlo interno, ADN de 10^4 ooquistos e de salada Va2; Ci 2: controlo interno ADN de 10^4 ooquistos e de salada Fant. I; 1: amostra Va2; 2: amostra Fm2; 3: amostra Fant. I; 4: amostra AG2; 5: amostra Vp1; C(-): controlo negativo.

4.3. Identificação de espécies/genótipos de *Giardia* e *Cryptosporidium* por sequenciação

Nas amostras onde se obteve amplificação pelo qPCR e/ou nested-PCR, procedeu-se à purificação e sequenciação dos produtos resultantes da reação.

Em relação à *Giardia*, só se observou amplificação em uma amostra (Fm2) no nested-PCR do gene *ssu rRNA*.

O alinhamento das sequências (senso e anti-senso) do fragmento 292pb mostrou homologia (100 %) com *G. lamblia* do genótipo A (Portland-I, M54878) (Fig. 11).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
G.lamblia small subunit ribosomal (16S-like) RNA	540	540	100%	9e-158	100%	M54878.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
540 bits(292)	9e-158	292/292(100%)	0/292(0%)	Plus/Plus
Fm2 1		CATCCGGTCGATCCTGCCGGAGCGCGACGCTCTCCCCAAGGACGAAGCCAIGCATGCCCG		60
Portland-I 1		CATCCGGTCGATCCTGCCGGAGCGCGACGCTCTCCCCAAGGACGAAGCCAIGCATGCCCG		60
Fm2 61		CTCACC CGGACGCGGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCGCGGGTCCCTG		120
Portland-I 61		CTCACC CGGACGCGGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCGCGGGTCCCTG		120
Fm2 121		CTAGCCGGACACCGCTGGCAACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGGGCGGGCGCCCGCG		180
Portland-I 121		CTAGCCGGACACCGCTGGCAACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGGGCGGGCGCCCGCG		180
Fm2 181		GGCGAGCAGCGTGACGCAGCGACGGCCCGCCGGGCTTCCGGGGCATCACCCGGTTCGGCG		240
Portland-I 181		GGCGAGCAGCGTGACGCAGCGACGGCCCGCCGGGCTTCCGGGGCATCACCCGGTTCGGCG		240
Fm2 241		CGGTCGCGGGCGCGCGAGGGCCCGACGCCCTGGCGGAGAAICAGGGTTCGACT		292
Portland-I 241		CGGTCGCGGGCGCGCGAGGGCCCGACGCCCTGGCGGAGAAICAGGGTTCGACT		292

Figura 11. Alinhamento múltiplo de fragmentos de seqüências do gene *ssu rRNA* de *G. lamblia* da estirpe referência Portland-I (M54878) e da amostra Fm2. O programa BLAST foi utilizado para comparar as seqüências nucleotídicas disponíveis no GenBank.

Em relação ao *Cryptosporidium*, observou-se no qPCR a amplificação do gene *18S rDNA* em duas amostras (Vm1 e Va1) de saladas.

Contudo, o alinhamento das seqüências (senso e anti-senso) do fragmento 315 pb mostrou 95% homologia da amostra Vm1 com o fungo *Cryptococcus peneaus* (Fig. 12) e de 97-99% de homologia da amostra Va1 com o fungo *Dioszegia antarctica* (Fig. 13).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Cryptococcus peneaus strain Nb42HA-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	379	379	100%	1e-101	95%	KR336839.1
<input type="checkbox"/> Tremella leptoqii isolate AM81 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	379	379	100%	1e-101	95%	JN043531.1
<input type="checkbox"/> Tremella lobariacearum isolate AM80 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	379	379	100%	1e-101	95%	JN043528.1
<input type="checkbox"/> Cryptococcus carneascens isolate C65 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	379	379	100%	1e-101	95%	DQ459618.1
<input type="checkbox"/> Cryptococcus peneaus gene for 18S rRNA, partial sequence, strain CBS 2409	379	379	100%	1e-101	95%	AB085799.1
<input type="checkbox"/> Cryptococcus sp. Aspov5E 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	375	375	100%	2e-100	95%	AY234175.1
<input type="checkbox"/> Cryptococcus sp. AsA4.1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	374	374	100%	6e-100	95%	KM586996.1
<input type="checkbox"/> Cryptococcus sp. AnA8.2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	374	374	100%	6e-100	95%	KM586994.1
<input type="checkbox"/> Dioszegia butyracea strain CBS10122 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	374	374	100%	6e-100	95%	KF036669.1
<input type="checkbox"/> Uncultured Basidiomycota clone B1.7.1E.116 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	374	374	100%	6e-100	95%	JQ627513.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
379 bits(205)	1e-101	229/241(95%)	0/241(0%)	Plus/Plus
VmI 1	AGGAACAAC	TGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAGTAGCG		60
<i>C. peneaus</i> 466	AGGAACAAC	TGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAGTAGCG		525
VmI 61	TATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTCAAACCTTCGGGTTCGGGCGGGATGGT		120	
<i>C. peneaus</i> 526	TATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTCAAACCTTCGGGTTCGGGCGGGATGGT		585	
VmI 121	CCGCCTTACGGTGTGTACTGTCTTGCTGGACCTTACCTCTTGGTGAGACCTTATGCTCTT		180	
<i>C. peneaus</i> 586	CCGCCTTACGGTGTGTACTGTCTTGCTGGACCTTACCTCTTGGTGAGACCTTATGCTCTT		645	
VmI 181	TACTGGGTGTGGGGTGGAAACCAGGAATTTTACCTTGAAAAAATTAAAGTGCTTAAAGCAG		240	
<i>C. peneaus</i> 646	TACTGGGTGTGGGGTGGAAACCAGGAATTTTACCTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAG		705	
VmI 241	G 241			
<i>C. peneaus</i> 706	G 706			

Figura 12. Alinhamento múltiplo de fragmentos de sequências do gene 18 S *rDNA* da amostra de salada VmI. O programa BLAST foi utilizado para comparar as sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Dioszegia antarctica strain CBS10920 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	448	448	100%	4e-122	99%	KF036667.1
<input type="checkbox"/> Dioszegia fristingensis strain AS 2.3763 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete s	442	442	100%	2e-120	98%	EU517066.1
<input type="checkbox"/> Dioszegia butyracea strain CBS10122 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	436	436	100%	8e-119	98%	KF036669.1
<input type="checkbox"/> Uncultured Agaricomycotina clone D0810_37_M small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	436	436	100%	8e-119	98%	EU647147.1
<input type="checkbox"/> Uncultured Agaricomycotina clone D0810_08_M small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	436	436	100%	8e-119	98%	EU647119.1
<input type="checkbox"/> Dioszegia buhagiarii strain AS 2.3748 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	436	436	100%	8e-119	98%	EU517065.1
<input type="checkbox"/> Dioszegia hungarica gene for 18S rRNA, partial sequence	436	436	100%	8e-119	98%	AB032638.1
<input type="checkbox"/> Dioszegia changbaiensis 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequ	431	431	100%	4e-117	98%	AY242817.1
<input type="checkbox"/> Dioszegia aurantiaca gene for 18S rRNA, partial sequence, strain JCM 2956	431	431	100%	4e-117	98%	AB049615.1
<input type="checkbox"/> Dioszegia crocea gene for 18S ribosomal RNA	431	431	100%	4e-117	98%	D31648.2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
433 bits(234)	1e-117	240/243(99%)	0/243(0%)	Plus/Plus
Val 1		CGAGGAACAAC TGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAGTAG		60
<i>D. antarctica</i> 468		CGAGGAACAAC TGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAGTAG		527
Val 61		CGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTCGAACTTCGGGTCTGGCGGGATG		120
<i>D. antarctica</i> 528		CGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTCGAACTTCGGGTCTGGCGGGATG		587
Val 121		GTCCGCCTTACGGTGTGTACTGTCTTGCCGGATCTTACCTCTTGGTGAAGCCTTATGTCC		180
<i>D. antarctica</i> 588		GTCCGCCTTACGGTGTGTACTGTCTTGCCGGATCTTACCTCTTGGTGAAGCCTTATGTCC		647
Val 181		TTTACTGGGTGTAGGGTCGAACCAGGAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGC		240
<i>D. antarctica</i> 648		TTTACTGGGTGTAGGGTCGAACCAGGAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCAAAGC		707
Val 241	AGG 243			
<i>D. antarctica</i> 708	AGG 710			

Figura 13. Alinhamento múltiplo de fragmentos de seqüências do gene 18S rRNA da amostra Val. O programa BLAST foi utilizado para comparar as seqüências nucleotídicas disponíveis no GenBank.

4.4. Determinação do limite de detecção de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.* no qPCR e nested-PCR

4.4.1. *Giardia lamblia*

Como já foi referido anteriormente nos materiais e métodos, o limite de detecção de *G. lamblia* na técnica de qPCR é de 1 trofozoíto (Almeida *et al.*, 2010).

Para determinar a sensibilidade do nested-PCR do gene *ssu rRNA* na detecção de *G. lamblia*, utilizou-se ADN (305 µg/ml) extraído de culturas de *G. lamblia* (WBC6). A partir desta amostra de ADN procederam-se a várias diluições (1:10 – 1:100 000 000) e realizaram-se as reacções de amplificação. Verificou-se que houve amplificação dos fragmentos de ADN (282pb) de *G. lamblia* em todas as diluições, com exceção da diluição 1:100.000.000 (Fig. 14). O limite de detecção é, deste modo, de 30,5 pg/ml de ADN de *G. lamblia*.

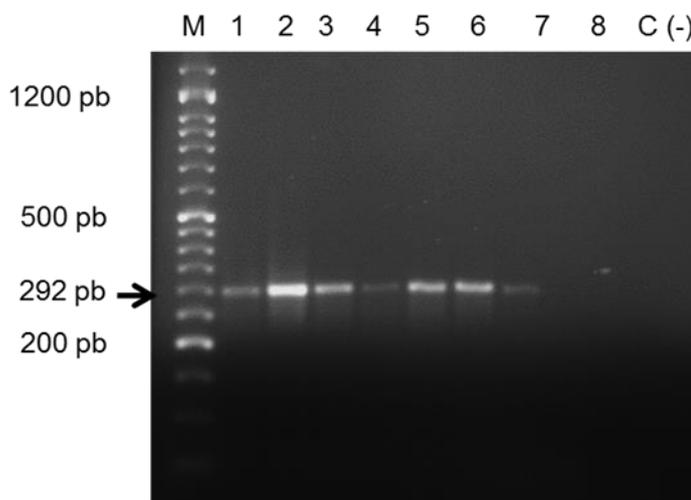


Figura 14. Separação electroforética em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio dos produtos do nested-PCR do gene *ssu rRNA* de diluições de ADN de *G. lamblia* referência (WBC6). M: marcador de massa molecular NzyDNA Ladder VI (Nzytech); 1 - diluição 1:10; 2 - diluição 1:100; 3 - diluição 1:1.000; 4 - diluição 1:10.000; 5 - diluição 1:100.000; 6 - diluição 1:1000.000; 7 - diluição de 1:10.000.000; 8 - diluição 1:100.000.000; C(-): controlo negativo.

4.4.2. *Cryptosporidium* sp.

De forma a determinar a sensibilidade do qPCR do gene *18S rDNA* na detecção de *Cryptosporidium*, foram utilizadas amostras de ADN (INI Crypto) extraído a partir de uma suspensão de ooquistos diluída (1:10; 1:100; 1:10 000; 1:100 000) com número decrescente de ooquistos (1×10^4 ; 1×10^3 ; 1×10^2 ; 1×10 ; 1).

Verificou-se a amplificação em todas as amostras (Fig. 15) o que significa que o limite de detecção da qPCR corresponde à maior diluição utilizada (1:100 000) ou seja a 1 ooquisto do parasita.

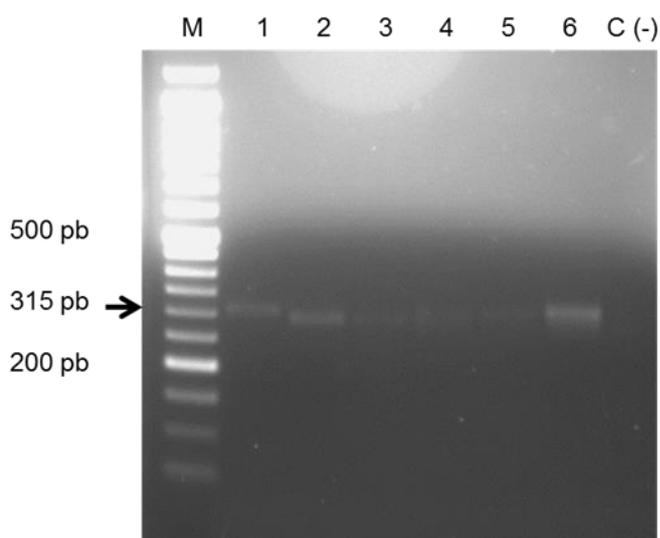


Figura 15. Separação electroforética em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio dos produtos amplificados no qPCR do gene *18S rDNA* de *Cryptosporidium* a partir de diferentes concentrações de ADN (números crescente de ooquistos). M: marcador de massa molecular NzyDNA Ladder VI (Nzytech); 1: um ooquisto; 2: 10 ooquistos; 3: 100 ooquistos; 4: 1.000ooquistos; 5: 10.000 ooquistos; 6: 100.000 ooquistos; C(-): controlo negativo.

No caso da técnica de nested-PCR utilizada na detecção de *Cryptosporidium* sp., verificou-se amplificação dos fragmentos de ADN (825pb) nas amostras correspondentes aos 100.000 ooquistos, 10.000 ooquistos, 1.000 ooquistos e 100 ooquistos (Fig. 16). Não houve amplificação do ADN das diluições 1:10.000 (10 ooquistos) e 1:100.000 (1 ooquisto) (Fig.17). Assim, o limite de detecção no nested-PCR foi de 100 ooquistos.

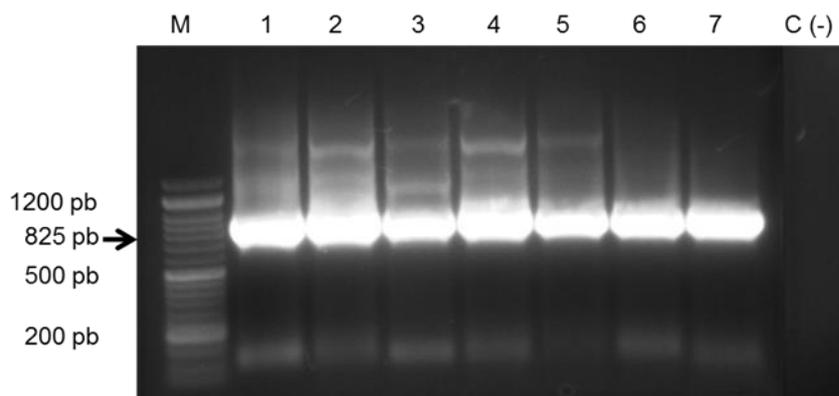


Figura 16. Separação electroforética em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio dos produtos amplificados (825pb) no nested-PCR do gene *ssu rRNA* de *Cryptosporidium* a partir de diferentes concentrações de ADN (diferentes números de ooquistos). M: marcador de massa molecular NzyDNA Ladder VI (Nzytech); 1: 100.000 ooquistos; 2: 50.000 ooquistos; 3: 10.000 ooquistos; 4: 5.000 ooquistos; 5: 1000 ooquistos; 6: 500 ooquistos; 7: 100 ooquistos; C(-): controlo negativo.

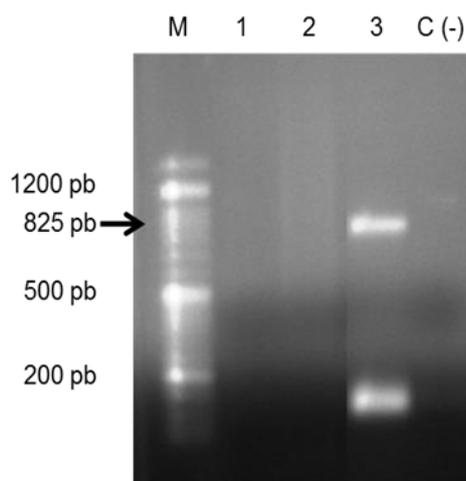


Figura 17. Separação electroforética em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio dos produtos amplificados (825pb) no nested-PCR do gene *ssu rRNA* de *Cryptosporidium* a partir de diferentes concentrações de ADN (diferentes números de ooquistos). M: marcador de massa molecular NzyDNA Ladder VI (Nzytech); 1: 1 ooquisto; 2: 10 ooquistos; 3: Controlo interno (ADN da salada + ADN de 100 ooquistos de *Cryptosporidium* sp.); C(-): controlo negativo.

Capítulo 5

Discussão

5. Discussão

As doenças transmitidas por alimentos têm sido alvo de muito interesse e atenção, uma vez que podem ter efeitos prejudiciais na saúde pública. As doenças alimentares afetam de modo mais grave certos grupos da população, os chamados grupos de risco, onde se incluem crianças, grávidas, idosos, utentes em instituições de saúde e pessoas com outros tipos de doenças (Adamu *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2016).

Associadas às doenças transmitidas por alimentos estão as parasitoses transmitidas através da ingestão de água e alimentos contaminados com formas parasitárias, que têm assumido grande relevância nos últimos anos. Destacam-se como potencialmente perigosos para a saúde humana os protozoários *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp., responsáveis por causar doenças do trato gastrointestinal (Nguyen *et al.*, 2016).

Atendendo a que a giardíase e criptosporidiose são doenças maioritariamente veiculadas por água e alimentos e que não existiam trabalhos descritos sobre *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em alimentos em Portugal, pretendeu-se no presente trabalho pesquisar a presença destes parasitas em saladas pré-embaladas de forma a avaliar o risco associado ao consumo deste tipo de alimentos.

As técnicas moleculares utilizadas neste estudo, qPCR, nested-PCR e sequenciação foram aplicadas com o objectivo de detetar ADN de *Giardia* sp. e de *Cryptosporidium* sp. e de identificar as espécies/genótipos destes parasitas.

Na deteção de *G. lamblia* por qPCR, das 24 amostras testadas ocorreu a amplificação de ADN numa amostra de salada (Fm2) (4,16%). A amplificação da amostra Fm2 ocorreu com os oligonucleótidos do gene *gdh* específicos do genótipo A, aproximadamente no *threshold cycle* 38. Valores altos de Ct, entre 38 e 40, podem ser indicativos de baixas quantidades de ADN alvo ou representarem uma contaminação ambiental (Ignatius *et al.*, 2012). Contudo, na técnica de nested-PCR, utilizando o gene *ssu rRNA*, de natureza múltipla cópia e com elevada sensibilidade (Adam, 2001; Thosmpson, 2016), obteve-se a amplificação de *G. lamblia* na amostra Fm2. O amplicão de 292 pb obtido no nested-PCR foi purificado e sequenciado e foi confirmada a caracterização do isolado de *G. lamblia* no genótipo A com 100% de homologia à estirpe de referência Portland-I (M54878). Estes resultados confirmaram que a amplificação no qPCR não foi inespecífica e que provavelmente a amostra tinha baixa quantidade de ADN de *G. lamblia*.

O facto de ter sido detetada *G. lamblia* genótipo A numa amostra de salada é muito preocupante porque este genótipo está associado a infeções no homem a nível mundial (Nguyen *et al.*, 2016). Atendendo à dose infecciosa deste parasita (10 a 100 ooquistos) e ao limite de deteção do qPCR (1 parasita) e do nested-PCR (30,5 ng/ml), a amostra positiva pode representar um risco para a saúde humana. Contudo, tem de se ter alguma prudência na análise de risco para a saúde humana aquando da ingestão da salada contaminada com *G. lamblia* e ter em consideração o nível de recuperação dos quistos presentes nas saladas, a dose infecciosa e a exposição nos grupos de risco. Embora o presente trabalho não tenha quantificado o número e a viabilidade dos quistos, a deteção de *G. lamblia* é só por si indicativo de que houve contaminação fecal da salada, representando um potencial risco para a saúde humana (Dixon *et al.*, 2012). A maioria das infeções por *G. lamblia* são assintomáticas em indivíduos saudáveis, mas podem apresentar consequências mais graves em determinados grupos de risco como crianças, indivíduos imunodeprimidos e idosos (Adamu *et al.*, 2013; Barreto *et al.*, 2010).

A presença de *G. lamblia* na salada Fm2 pode estar relacionado com o facto dos quistos de *Giardia* serem muito resistentes às condições a que estão sujeitos no meio ambiente, ao cloro utilizado no tratamento de águas para consumo humano e aos desinfetantes (Nguyen *et al.*, 2016). Como os quistos podem sobreviver no meio ambiente durante semanas ou até meses, a contaminação ambiental pode levar à contaminação da água e dos alimentos (Almeida *et al.*, 2010). No caso deste tipo de saladas pré-embaladas e prontas para consumo, a contaminação do produto pode ocorrer durante diferentes fases do processo.

Na fase da cultura e colheita dos vegetais pode ocorrer a contaminação através do contacto com o solo e/ou águas de irrigação. Neste contexto, a utilização de fezes de animais para a fertilização das terras pode constituir um risco elevado uma vez que existe grande probabilidade de estarem contaminadas com quistos do parasita (Erdogrul e Sener, 2004). A água utilizada na rega das saladas pode estar contaminada com os quistos de *Giardia* sp. proporcionando, assim, a disseminação deste parasita para os alimentos (Shields *et al.*, 2011). Vários estudos detetaram este protozoário na água de rega das culturas de vegetais e concluíram que era a água a fonte de contaminação do produto alimentar (Nichols *et al.*, 2007; Amorós *et al.*, 2010; Dixon *et al.*, 2012).

O manuseamento e a armazenagem dos vegetais em locais que possam estar contaminados com fezes humanas e/ou de animais são também factores de risco. No

processo final, lavagem e acondicionamento, as saladas são submetidas a processos de higienização e desinfecção antes de serem embaladas e, assim, os desinfetantes usados na água e a qualidade da própria água de lavagem serão determinantes no risco de contaminação durante o processo. A água de lavagem pode estar contaminada com quistos de *Giardia* sp. e os processos de desinfecção podem não ser eficazes na eliminação das formas parasitárias infectantes.

A contaminação dos alimentos pode estar também diretamente relacionada com deficientes práticas de higiene. As mãos dos manipuladores podem estar com quistos de *Giardia* sp. e, conseqüentemente, contaminar os alimentos aquando da sua manipulação (Dixon et al., 2012).

Em relação à deteção de *Cryptosporidium* sp., a técnica de qPCR foi seleccionada com base na sua prévia validação para o diagnóstico simultâneo de *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora cayetanensis*, *Eimeria* sp. e *Toxoplasma gondii* (Lalonde e Gajadhar, 2011) em amostras de fezes humanas e de animais. Com a aplicação deste qPCR nas amostras de saladas, verificou-se a amplificação de ADN em duas amostras (Vm1 e Va1) e nos controlos positivos. No entanto, no nested-PCR do gene *18S rDNA* não se observou amplificação em nenhuma das 24 amostras de saladas. De modo a confirmar se o produto amplificado no qPCR (315pb) era de *Cryptosporidium* sp., realizou-se o sequenciamento do produto e verificou-se que a sequência de ADN não apresentava homologia com *Cryptosporidium* sp.. Contudo, as sequências obtidas alinharam com sequências de fungos: a amostra Vm1 apresentou 95% de homologia com *Cryptococcus peneaus* e a amostra Va1 apresentou 99% de homologia com *Dioszegia antarctica*. Os autores que desenvolveram e validaram a técnica sustentaram a sua potencial aplicação em amostras de ambiente e alimentos, porém com necessidade de validação adequada e a utilização de controlos apropriados. No presente trabalho, foram utilizados os controlos positivos de *Cryptosporidium* sp. (INI Crypto, Anexo I) que amplificaram corretamente na curva de melting (*melting peak* de 82 °C). Este resultado seria indicativo que o qPCR era específico mas o que se verificou é que os oligonucleótidos apresentaram reação cruzada com ADN de fungos do ambiente. É importante realçar que no estudo efetuado com as amostras de fezes humanas e animais, os autores tinham já observado amplificação de ADN de *S. cerevisiae* (Lalonde e Gajadhar, 2011). Em conjunto, os resultados levam-nos a concluir que a amplificação de ADN de fungos em vez de *Cryptosporidium* sp. deve-se a uma reação cruzada (falso positivo) e que a matriz biológica (fezes, saladas, etc.) influencia a especificidade do método.

Quando não ocorre amplificação de ADN de *Cryptosporidium* não significa que as saladas não estão contaminadas com ooquistos do parasita. São vários os factores que influenciam o limite de deteção dos parasitas como a taxa de recuperação das estruturas parasitárias aquando do processamento da salada, a eficácia da ruptura dos ooquistos durante a extração do ADN e a sensibilidade da técnica de amplificação. As taxas de recuperação de ooquistos nas saladas nunca é de 100%, dependendo da solução utilizada no processamento e do tipo de vegetal (Shields *et al.*, 2011). Por exemplo, em manjerição a taxa de recuperação de ooquistos de *Cryptosporidium* sp. variou de 65,5 a 79,7 % (Shields *et al.*, 2011).

No presente trabalho, o limite de deteção para *Cryptosporidium* sp. na técnica de qPCR foi de 1 ooquisto e na técnica de nested-PCR foi de 100 ooquistos. Portanto, pode-se afirmar que são técnicas muito sensíveis: por exemplo, considerando-se uma taxa de recuperação de 60% e total extração do ADN, consegue-se detetar o ADN de *Cryptosporidium* sp. a partir de amostras contaminadas no mínimo com 20 ooquistos (qPCR) ou com 168 ooquistos (nested-PCR).

Seria importante desenvolver estudos para avaliar o nível de sobrevivência dos quistos de *Giardia* sp. e dos ooquistos de *Cryptosporidium* sp. perante variadas condições ambientais, de modo a serem implementadas medidas de controlo para minimizar a contaminação de alimentos. Segundo Dixon e colaboradores (2012) é importante que se realizem estes estudos para controlar e minimizar as doenças de origem alimentar associadas a estes parasitas.

Adicionalmente, é importante estabelecer análises de risco com base em Planos HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point* - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo) de forma a realizar uma gestão eficaz do risco de contaminação de vegetais utilizados na preparação das saladas pré-embaladas. A gestão deve ser fundamentada em planos de prevenção, monitorização e controlo de contaminações por parasitas relevantes, como é o caso dos quistos de *Giardia* sp. e ooquistos de *Cryptosporidium* sp.. Os planos devem incluir as boas práticas agrícolas, controlando a utilização de fezes de animais para fertilizar as terras; a monitorização da água de rega e também a de higienização e desinfeção dos vegetais, no que diz respeito à verificação da presença de formas parasitárias; limitar o acesso de animais às áreas de cultivo de vegetais; realização de planos de formação e sensibilização para os manipuladores que trabalham no cultivo, na colheita, no

processamento, no armazenamento e transporte deste tipo de vegetais, que estão prontos para consumo (Dixon *et al.*, 2012).

Os referidos Planos de HACCP, devem incluir uma análise de risco para *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp., bem como para outros parasitas relevantes como *Cyclospora* sp., *Entamoeba histolytica*, *Enterobius vermicularis* e *Ascaris* sp. uma vez que já foram detetados em vegetais (Erdogrul e Sener, 2004, Cook *et al.*, 2007, Dixon *et al.*, 2012).

Em conclusão, as técnicas de biologia molecular seleccionadas para este estudo foram aplicadas com sucesso e permitiram atingir o objetivo proposto de detetar *G. lamblia* e *Cryptosporidium* sp. em amostras de saladas pré-embaladas. Nas amostras de saladas pré-embaladas foi detetada a presença de *Giardia lamblia*, genótipo A, indicativo de contaminação fecal da salada, podendo representar risco para a saúde do consumidor. É importante estabelecer medidas de prevenção e controlo de *Giardia* e *Cryptosporidium* em todo o setor de produção, processamento, embalagem e transporte das saladas pré-embaladas e prontas para consumo humano.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- ADAM, R. D. - Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, (2001), 447-475.
- ADAMU, H., WEGAYEHU. T., PETROS, B. - High prevalence of diarrhoeagenic intestinal parasite infections among non-ART HIV patients in Fitcha Hospital, Ethiopia. *PLoS One*, 8 (2013), 5-9.
- ALMEIDA, A., POZIO, E., CACCIÒ, M. - Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. *Applied and Environmental Microbiology*, (2010), 1895-1901.
- AMORÓS, I., ALONSO, J. L., CUESTA, G. - *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts on salad products irrigated with contaminated water. *Journal of Food Protection*, 6, (2010), 1016-1200.
- ANKARKLEV, J. [et.al]- Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology*. 8, (2010) 413-22.
- APPELBEE, A. J. [et.al] - Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta. *Veterinary Parasitology*, 112, (2003), 289-294.
- ARAÚJO, R. - Quantificação e caracterização genotípica de *Cryptosporidium* spp. isolados de água bruta superficial e esgoto bruto para a monitorização em mananciais de abastecimento público na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP). São Paulo: [S.n.], 2015. Tese de doutoramento.
- ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - Autoridade Europeia de Segurança Alimentar EFSA. 2015. [Acedido a 9 de setembro de 2016]. Disponível na Internet: www.asae.pt
- ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - Perigos de Origem Alimentar. 2016. [Acedido a 10 de setembro de 2016]. Disponível na Internet: www.asae.pt

Referências Bibliográficas

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - Riscos Biológicos. 2016. [Acedido a 12 de setembro de 2016]. Disponível na Internet:www.asae.pt

BARRETO, M. L., GENSER, B., STRINA, A., TEIXEIRA, M. G., ASSIS, A. M. O., REGO, R. F., et al. Impact of a citywide sanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. *Environmental Health Perspectives*, 118 (2010), 1637-1642.

BOUZID, M. [et.al] - *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, (2013), 115-134.

CACCIO, S. M., RYAN, U. - Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160, (2008), 75-80.

CAPONIGRO, V. [et.al] - Variation of microbial load and visual quality of read-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retailer. *Food Microbiology*. 27, (2010), 1071-1077.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. Giardiasis. 2013. [Acedido a 5 de setembro de 2016]. Disponível na Internet:<http://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - *Cryptosporidium*. 2015a. [Acedido a 6 de setembro de 2016]. Disponível na Internet:<http://www.cdc.gov/parasites/crypto/pathogen.html>

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - *Cryptosporidium* - Illness&Symptoms. 2015b. [Acedido a 6 e 7 de setembro de 2016]. Disponível na Internet: <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/illness.html>

CHALMERS, R. M., KATZER, F. - Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology*, 29, (2013), 237-251.

COOK, N. [et.al] - Development of a method for detection of *Giardia duodenalis* cysts on lettuce and for simultaneous analysis of salad products for the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, (2007), 7388-7391.

COKLIN, T. [et.al] - Temporal Changes in the prevalence and shedding patterns of *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in a herd of dairy calves in Ontario. *Canadian Veterinary Journal*. 51, (2010), 841-846.

DAWSON, D. - Foodborne protozoan parasitoses. *International Journal of Food Microbiology*, 103, (2005), 207-227.

DIXON, B. [et.al]. (2012) - Detection of *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in Ready-to-Eat Packaged Leafy Greens in Ontario, Canada. *J. of Food Prot.* 76, (2013), 307-313.

EFSA - European Food Safety Authority - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. 2015 [Acedido a 9 de setembro de 2016]. Disponível na internet: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4329>

ERDOGRUL, O., SENER, H. - The contamination of various fruit and vegetable with *Enterobius vermicularis*, *Ascaris* eggs, *Entamoeba histolyca* cysts and *Giardia* cysts. *Food Control*. 16, (2005), 559-562.

ESPELAGE, W. [et.al] - Characteristics and risk factors for symptomatic *Giardia lamblia* infections in Germany. *BioMed Central Public Health*. 10, (2010), 2-9

FAUBERT, G. - Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 13, (2000), 35-54.

FARIA, C. P. [et.al] - Molecular Characterization of *Giardia lamblia*: First Report of Assemblage B in Human Isolates from Rio de Janeiro (Brazil). *PLOS one*. 11, (2016), 1-14

Referências Bibliográficas

FENG, Y., XIAO, L. - Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 24, (2011), 110-40.

FORD, B. J. - The Discovery of *Giardia*. *The Microscope*. 53, (2005), 147-53.

FRANCO, R. M. - Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. *Revista Panamericana de Infectología*, 9, (2007), 36-43.

HOPKINS, R. M. [et.al]. - Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *Journal of Parasitology*, 83, (1997), 44-51.

IGNATIUS, R. [et al.] - High prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B infection and association with underweight in Rwandan children. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 6, (2012), e1677.

KELLEY, W. D. [et.al] - Agricultural Use of Sewage Sludge: A Literature Review. Blacksburg. Virginia: Virginia Water Resources Research Center, 1984. [Acedido a 7 de Setembro de 2016]. Disponível na internet: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.540.5971&rep=rep1&type=pdf>

LALONDE, L., GAJADHAR, A. - Detection and differentiation of coccidian oocysts by real-time pcr and melting curve analysis. *Journal of Parasitology*, 97, (2011), 725-730.

LASEK-NESELQUIST, E., WELCH, D. M., SOGIN, M. L. - The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *International Journal for Parasitology*, 40, (2010), 1063-1074.

LUDWING, K. M. [et.al] - Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 32, (1999), 547-555.

MARTINS, J. - Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp., provenientes de amostras fecais de origem humana da Baixada Santista, estado de São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da glutamato desidrogenase (*gdh*) e beta-giardina (*bg*). São Paulo: [S.n.], 2010. Dissertação de mestrado.

MONIS, P. T., THOMPSON, R.C. - *Cryptosporidium* and *Giardia* - zoonoses: fact or fiction? *Infection, Genetic and Evolution*. 3, (2003), 233-244.

MONIS, P. T. [et.al] - Molecular systematics of the parasitic protozoan *giardia intestinalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 16, (1999), 1135-1144.

NGUYEN, T.T. [et.al] - Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in environmental samples in Hanam province, Vietnam. *Food and Waterborne Parasitology*, 3, (2016), 13-20.

OLIVEIRA, A. [et.al] - Doenças transmitidas por alimentos principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. *HCPA*, 30, (2010), 279-285.

PERÉZ-CORDÓN, G. [et.al] - Discovery of new variable number tandem repeat loci in multiple *Cryptosporidium parvum* genomes for the surveillance and investigation of outbreaks of cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 169, (2016), 119-128.

PLUTZER, J., KARANIS, P. - Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Veterinary Parasitology*, 165, (2009), 187-199.

QUIAGEN - QIAamp DNA Mini and Blood mini Handbook (2010).

REHN, M. [et.al] - Post-infection symptoms following two large waterborne outbreaks of *Cryptosporidium hominis* in Northern Sweden, 2010-2011. *BioMed Central Public Health*. 15, (2015), 2-6

ROBERTSON, L. J. [et.al] - Giardiasis - why do the symptoms sometimes never stop? *Trends in Parasitology*, 26, (2010), 75-82.

Referências Bibliográficas

ROSE, J. B., SLIFKO, T. R. - *Giardia, Cryptosporidium and Cyclospora* and their impact on food: a review. *Journal of Food Protection*, 62, (1999), 1059-1070.

SAHAGUN, J. [et.al] - Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 27, (2008), 81-83.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. - DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, (1977), 5463-5467.

SANTOS, T., JUNQUEIRA, N., PEREIRA, L., - Microrganismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processados. *Brazilian Journal of Food Technology*, 13, (2010), 141-146.

SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, A. – *Giardia* and *Cryptosporidium* join the Neglected Diseases initiative. *Trends in Parasitology*, 22, (2006), 203-208.

SCOTT, K. G., [et.al] - Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase - dependent fashion. *Gastroenterology*, 123, (2002), 1179-1190.

SHIELDS, J., LEE, M., MURPHY, H. - Use of a common laboratory glass detergent improves recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayentanensis* from lettuce, herbs and raspberries. *International Journal of Food Microbiology*, 153, (2012), 123-128.

SHUVAL, H. I., YEKUTIEL, P., FATTAL, B. - Epidemiological evidence for helminth and cholera transmission by vegetables irrigated with wastewater: Jerusalem - a case study. *Water Science and Technology*, 17, (1984), 433-442.

SMITH, H. V., [et.al] - Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infectios in humans. *Trends in Parasitology*, 22, (2006), 160-167.

- SODERQVIST, K., [et.al] - Foodborne bacterial pathogens in retail prepacked ready-to-eat mixed ingredient salads. *Journal of Food Protection*, 6, (2016), 896-1055.
- SOUSA, M.C. - Interação de *Giardia lamblia* com células intestinais e agentes antimicrobianos. Coimbra: [Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra], 2002. Tese de doutoramento.
- SOUZA, R., [et.al] - Micro-organismos da subclasse coccidia: resistência e implicações para o processamento de materiais de assistência à saúde. *Rev. Esc. Enferm.USP.* 46, (2012), 466-471.
- SPRONG, H., CACCIO, S. M., VAN DER GIESSEN, J. W. - Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3, (2009), e558
- TABAN, B., HALKMAN, A. K. - Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, 17, (2011), 286-287.
- TAKAHASHI, H. [et.al] - Viability of murine norovirus in salads and dressings and its inactivation using heat-denatured lysozyme. *International Journal of Food Microbiology*, 233, (2016), 29-33.
- THOMPSON, R.C. - The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitology*, 126, (2004), 15-35.
- THOMPSON, R. C., HOPKINS, R. M., HOMAN, W. L. - Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today*, 16, (2000), 210-213.
- THOMPSON, R. C. A., ASH, A. - Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics, Evolution*, 40 (2016), 315-323.
- VESTRHEIM, D.F., [et.al] - Are ready-to-eat salads ready to eat? An outbreak of *Salmonella* Coeln linked to imported, mixed, pre-washed and bagged salad, Norway, November 2013. *Epidemiology and Infection*, 144, (2016), 1756-1760.

Referências Bibliográficas

WHO - World Health Organization - Health topics - Foodborne diseases. 2016. [Acedido a 6 e 7 de setembro de 2016]. Disponível na Internet: http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/en/

WHO (2003), Codex Alimentarius: recommended international code of practice general principles of food hygiene. CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003. Rome: Codex Alimentarius Comission.

XIAO, L. [et.al] - Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Applied and Environmental Microbiology, 65, (1999), 1578-1583.

YAMOUDY, M. [et.al] - Isolation of toxigenic *Clostridium difficile* from ready-to-eat salads by multiplex polymerase chain reaction in Isfahan, Iran. Advanced Biomedical Research, 4, (2015).

Anexo

Anexo I

Alinhamento múltiplo de fragmentos de sequências do gene 18S *rDNA* da amostra de *Cryptosporidium* (INI Crypto). O programa BLAST foi utilizado para comparar com a sequência nucleotídica de *Cryptosporidium* sp. ssu rRNA IS08 (KX056089).

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	351 bits(190)	2e-93	190/190(100%)	0/190(0%)	Plus/Plus
INI Crypto	1	ACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGICTGGTGCCAGCAGCCGGTAATCCAGCTCCAATA	60		
<i>Cryptosporidium</i> sp.	297	ACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGICTGGTGCCAGCAGCCGGTAATCCAGCTCCAATA	356		
INI Crypto	61	GCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGITGGATTTCTGttaataatttat	120		
<i>Cryptosporidium</i> sp.	357	GCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGITGGATTTCTGTTAATAATTTAT	416		
INI Crypto	121	ataaaaatattttgatgaatatttatataatattaacataattcatattactatttttttt	180		
<i>Cryptosporidium</i> sp.	417	ATAAAATATTTTGATGAATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTATTTTTTTT	476		
INI Crypto	181	tttAGAATAT	190		
<i>Cryptosporidium</i> sp.	477	TTTAGAATAT	486		