



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Miguel Carlos Rodrigues Pinto

SALADAS EMBALADAS PRONTAS A CONSUMIR:
DETEÇÃO MOLECULAR DE *GIARDIA*
LAMBLIA E *CRYPTOSPORIDIUM SP.*

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar
orientada pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues
de Sousa e apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade de Coimbra

Setembro de 2022



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Miguel Carlos Rodrigues Pinto

Saladas embaladas prontas a consumir: deteção molecular
de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.*

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pela
Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Coimbra, setembro de 2022

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

Agradecimentos

Desejo agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desta etapa.

Em primeiro lugar, agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Maria do Céu Sousa, por todo o apoio, disponibilidade e incentivo transmitidos ao longo deste trabalho. Agradeço também todos os conhecimentos transmitidos, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Doutora Clarissa e ao Doutor Tiago, pela ajuda e disponibilidade durante o tempo que me acompanharam.

À Sandra Ferreira, funcionária do laboratório, pela ajuda, disponibilidade e colaboração na preparação dos materiais necessários para a realização do trabalho.

À Daniela, colega de laboratório, pelo incentivo, apoio e disponibilidade durante o trabalho.

A todos os meus amigos que direta e indiretamente me apoiaram e incentivaram para a conclusão deste projeto.

Aos meus familiares e em especial à minha madrinha, pelo apoio e incentivo demonstrados, não só durante esta etapa, mas também durante todo o meu percurso académico.

E por fim agradecer a Deus pela coragem e determinação durante esta etapa.

Muito obrigado a todos!

Índice

Índice de tabelas.....	5
Índice de figuras.....	6
1. Introdução.....	11
1.1. Segurança alimentar.....	11
1.2. Perigos com origem nos alimentos.....	13
1.3. Saladas: benefícios e causas de contaminação.....	19
1.4. <i>Giardia lamblia</i> e giardíase.....	20
1.5. <i>Cryptosporidium sp.</i> e criptosporidiose.....	23
2. Objetivos.....	27
3. Material e métodos.....	29
3.1. Caracterização e processamento das amostras.....	29
3.2. Extração de ADN total.....	31
3.3. Nested-PCR.....	32
3.3.1. <i>Giardia lamblia</i>	32
3.3.2. <i>Cryptosporidium sp.</i>	33
3.4. Eletroforese e visualização dos fragmentos de ADN amplificados no nested-PCR	34
3.5. Purificação dos produtos de PCR e sequenciação.....	35
4. Resultados.....	38
4.1. Detecção de <i>Giardia lamblia</i> por nested-PCR.....	38
4.2. Detecção de <i>Cryptosporidium sp.</i> por nested-PCR.....	39
4.3. Identificação de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> por sequenciação.....	41
5. Discussão.....	43
Referências bibliográficas.....	48
Anexos.....	55

Índice de tabelas

Tabela 1 Identificação de perigos com origem nos alimentos	13
Tabela 2 Classificação dos microrganismos de acordo com o seu perigo e difusão.....	15
Tabela 3 Bactérias associadas a doenças transmitidas por alimentos.....	16
Tabela 4. Parasitas envolvidos em Doenças de Origem Alimentar	18
Tabela 5 Espécies de <i>Giardia</i> e os seus hospedeiros.....	20
Tabela 6 Genótipos de <i>Giardia lamblia</i> e os seus hospedeiros	21
Tabela 7 Exemplos de algumas espécies de <i>Cryptosporidium</i> e os seus hospedeiros.....	23
Tabela 8 Identificação e caracterização das amostras	29
Tabela 9 Oligonucleotídeos sintéticos utilizados nas reações nested-PCR para deteção de <i>Giardia lamblia</i>	32
Tabela 10 Composição da mistura utilizada no nested-PCR para deteção de <i>Giardia</i>	33
Tabela 11 Oligonucleotídeos sintéticos utilizados nas reações de nested-PCR para deteção de <i>Cryptosporidium</i> sp.	33
Tabela 12 Composição da mistura utilizada na reação de nested-PCR para deteção de <i>Cryptosporidium</i> sp.	34
Tabela 13 Deteção de <i>Giardia lamblia</i> por nested-PCR	39
Tabela 14 Deteção de <i>Cryptosporidium</i> sp. por nested-PCR	40

Índice de figuras

Figura 1 Pré-requisitos do sistema HACCP	12
Figura 2 Ciclo de vida de <i>Giardia</i>	22
Figura 3 Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> sp.	25
Figura 4 Separação eletroforética em gel de agarose a 1,2% e coloração de brometo de etídeo dos produtos do nested-PCR do gene ssu rRNA de <i>Giardia lamblia</i>	38
Figura 5 Separação eletroforética em gel de agarose 0,9% e coloração com brometo de etídeo dos produtos do nested-PCR do gene ssu rRNA de <i>Cryptosporidium</i> sp.....	39
Figura 6 Separação eletroforética em gel de agarose 0,9% e coloração com brometo de etídeo dos produtos do nested-PCR do gene ssu rRNA de <i>Cryptosporidium</i> sp.....	40

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
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar)
EUA	Estados Unidos da América
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i> (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo)
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 de 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

A procura por uma alimentação saudável está cada vez mais presente no dia a dia das pessoas devido aos seus benefícios nutricionais e melhor qualidade de vida. Em resultado disso, um dos produtos que as pessoas mais procuram são as saladas pré-embaladas, que se encontram prontas para consumo, pois são uma categoria de alimento de rápida utilização, são práticas e não precisam de nenhum tipo de processamento. No entanto o consumo de saladas pode estar associado a parasitoses intestinais, como por exemplo através de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.*. A transmissão ocorre via fecal-oral, e pode ocorrer diretamente, através do contacto com pessoas e animais infetados, e pode ocorrer indiretamente, através da ingestão de água e alimentos que se encontrem contaminados. A contaminação pode ocorrer através do uso de efluentes de esgoto para fins de irrigação, aplicação de fezes de animais como fertilizantes e a falta de saneamento ou de higiene pessoal nos locais onde manipulam as saladas. Estas estruturas parasitárias também se caracterizam por serem muito resistentes ao ambiente e também a tratamentos efetuados à água.

O objetivo deste trabalho passa pela deteção molecular dos protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.* em saladas embaladas prontas a consumir de forma a avaliar a segurança deste alimento.

Foram adquiridas e analisadas, 40 amostras de saladas pré-embaladas de quatro variedades diferentes, durante um período de 6 meses, de setembro de 2021 até fevereiro de 2022. A extração do ADN foi realizada utilizando-se o kit comercial *NZY Tissue gDNA Isolation Kit (nzytech)*. A deteção foi realizada através de nested-PCR e por fim a caracterização das espécies e genótipos foi realizada por sequenciação.

Nenhuma amostra de salada em estudo apresentou a amplificação específica de *G. lamblia*. No entanto relativamente ao *Cryptosporidium*, algumas amostras apresentaram amplificações levantando dúvidas relativamente à sua especificidade. Após sequenciação, não foi apresentada homologia com *Cryptosporidium*.

Embora neste estudo não se tenha detetado os parasitas em estudo, diversos estudos já realizados conseguiram detetar. É, portanto, de elevada necessidade, que sejam implementadas medidas de prevenção e controlo relativamente aos parasitas, em todas as etapas desde o campo até ao consumidor.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium sp.*, saladas pré-embaladas, segurança alimentar, nested-PCR, sequenciação.

Abstract

The search for a healthy diet is increasingly in people's daily lives due to its nutritional benefits and better quality of life. As a result, one of the products that people are most looking for is pre-packaged salads, which are ready to eat, as they are a quick to use, are practical and do not require any type of processing. However, salad consumption may be associated with intestinal parasitosis, such as *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium sp.*. Transmission occurs via the fecal-oral route, and can occur directly, through contact with infected people and animals, and can occur indirectly, through the ingestion of contaminated food and water. Contamination can occur through the use of sewage effluents for irrigation purposes, application of animal feces as fertilizer, and lack of sanitation or personal hygiene in the places where salads are handled. These parasitic structures are also characterized by being very resistant to the environment and also to water treatments.

The objective of this work is the molecular detection of the protozoa *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium sp.*, in ready-to-eat packaged salads in order to assess the safety of this food.

40 samples of pre-packaged salads of four different varieties were acquired and analyzed during a period of 6 months, from September 2021 to February 2022. DNA extraction was performed using the commercial kit *NZY Tissue gDNA Isolation Kit (nzytech)*. The detection was performed by nested-PCR and finally the characterization of species and genotypes was performed by sequencing.

No salad sample in the study showed the specific amplification of *G. lamblia*. However, regarding *Cryptosporidium*, some samples showed amplifications, raising doubts about its specificity. After sequencing, no homology to *Cryptosporidium* was shown.

Although in this study the parasites under study were not detected, several studies already carried out were able to detect them. It is therefore of great need that prevention and control measures are implemented in relation to parasites, at all stages from the field to the consumer.

Keywords: *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium sp.*, pre-packaged salads, food safety, nested-PCR, sequencing.

Capítulo I

Introdução

I. Introdução

I.1. Segurança alimentar

A alimentação é uma necessidade essencial do ser humano para sobreviver. Os nutrientes que são obtidos através do consumo dos alimentos fornecem energia para as atividades diárias. Os alimentos também apresentam um papel importante na cultura da sociedade dando uma identidade a uma comunidade. O consumo de alimentos também traz diferentes experiências através das sensações e sabores. Juntamente com a necessidade e prazer no consumo dos alimentos, todos devem ter direito à segurança alimentar.

A segurança alimentar refere-se às práticas que são observadas durante o manuseamento, processamento e distribuição dos alimentos para garantir que não existam agentes causadores de doenças e danos. Todos os membros da cadeia alimentar, passando por produtores/fabricantes, fornecedores, proprietários de uma empresa e até mesmo o cliente desempenham um papel fundamental na manutenção da segurança alimentar. O objetivo passa, portanto, por proteger os clientes de intoxicações alimentares e doenças transmitidas por alimentos que podem afetar a vida humana. Além do objetivo referido, existem outras vantagens como por exemplo, melhor desempenho dos negócios em empresas do setor alimentar, a redução do desperdício alimentar, uma melhor qualidade de vida para os consumidores, produção sustentável de alimentos e por fim a globalização de alimentos mais seguros (Njunina, 2021).

As doenças e lesões que estão associados aos alimentos são, na melhor das hipóteses, desagradáveis e na pior das hipóteses podem provocar a morte. No entanto, há outras consequências, como por exemplo, prejuízos no comércio e turismo e consequentemente desemprego. Além disso, a deterioração dos alimentos acaba por ser um desperdício, que tem um custo associado e pode afetar a confiança dos consumidores (Codex Alimentarius Commission, 2003).

Na década de 1960 foi desenvolvida a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (*Hazard Analysis and Critical Control Point*, HACCP) pela Administração Nacional de Aeronáutica e Espaço dos EUA (NASA) para assegurar a qualidade dos alimentos. A NASA pretendia garantir alimentos com propriedades de vida útil mais longas para as viagens espaciais e livres de fragmentos e de agentes patogénicos. Esta foi a primeira monitorização de agentes patogénicos e de exigência de medição imposta à indústria alimentícia (Weinroth, Belk e Belk, 2018).

Atualmente a metodologia HACCP, de acordo com o Regulamento CE, nº852/2004, faz parte das regras gerais destinadas aos operadores das empresas do setor alimentar no que se refere à higiene dos alimentos (*Regulamento (Ce) N.852/2004, 2011*).

O HACCP pode ser aplicado em toda a cadeia alimentar desde a matéria-prima até ao produto final. Para isso, existem sete princípios que são preconizados pelo HACCP: identificar os perigos e medidas preventivas; determinar os pontos críticos de controlo; estabelecimento de limites críticos em pontos críticos de controlo; monitorizar e controlar cada ponto crítico de controlo; estabelecimento de medidas corretivas; estabelecimento de procedimentos de verificação do sistema; e por fim a elaboração de documentos e registos (ASAE, 2007).

Para a aplicação efetiva do sistema HACCP devem ainda ser tidos em conta os pré-requisitos (Figura 1). Os pré-requisitos controlam os perigos associados ao meio envolvente ao processo de produção do género alimentício, enquanto o sistema HACCP controla os perigos associados ao processo de produção.

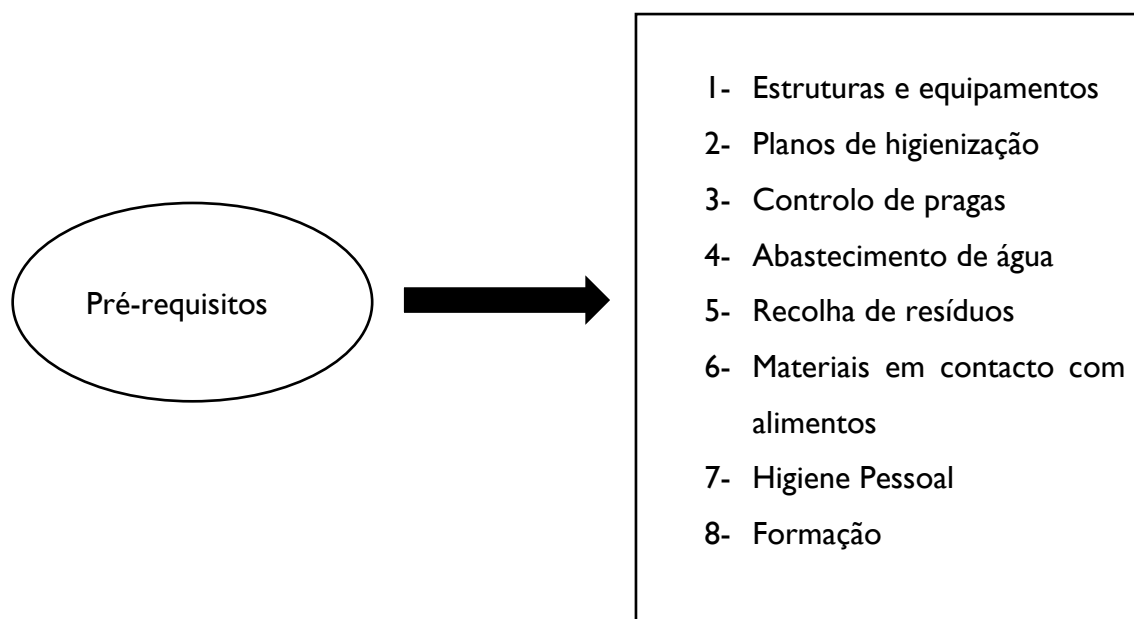


Figura 1 Pré-requisitos do sistema HACCP (Adaptado de ASAE, 2007)

A nível europeu, em 2002, a EFSA foi criada pelo Conselho e pelo Parlamento Europeu na sequência de uma série de incidentes graves de segurança alimentar, que acentuaram a necessidade de uma ampla revisão do sistema europeu de legislação alimentar (EFSA, 2013).

A EFSA tem como função emitir pareceres científicos imparciais e de elevada qualidade a fim de ajudar os decisores políticos a tomarem decisões informadas sobre os riscos associados à alimentação. A atividade principal da EFSA consiste na avaliação científica dos riscos e também tem um papel fundamental na comunicação dos seus pareceres aos principais

parceiros, partes interessadas e público de uma forma atempada, clara e eficaz, contribuindo para reduzir o fosso entre a comunidade científica e os consumidores (EFSA, 2012).

1.2. Perigos com origem nos alimentos

Perigo é definido como um agente biológico, químico ou físico com potencial para causar um efeito adverso à saúde (Codex Alimentarius Commission, 2003).

Os perigos são separados por categorias, perigos físicos, químicos, biológicos e nutricionais (Tabela I) (ASAE, 2018).

Tabela I Identificação de perigos com origem nos alimentos (Adaptado de ASAE, 2018)

Perigos biológicos	Bactérias, vírus, parasitas e príões.
Perigos químicos	Pesticidas, contaminadores inorgânicos tóxicos, antibióticos, promotores de crescimento, aditivos alimentares tóxicos, lubrificantes, tintas, toxinas do marisco (PSP, DSP), histamina (pescado), micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina), dioxinas, nitrosaminas, partículas dos materiais de embalagem.
Perigos físicos	Fragmentos de vidro, metal, plástico ou madeira, pedras, agulhas, espinhas, cascas, areia, adornos, ou outros materiais estranhos que possam causar dano ao consumidor.
Nutricionais	Sal em excesso, gorduras em excesso, açúcar em excesso e alergénios.

Estes perigos podem surgir através das contaminações cruzadas, sendo que é umas das principais causas dos surtos de doenças de origem alimentar. A contaminação cruzada está associada às más práticas de higiene, água e alimentos contaminados, contaminação pelos manipuladores, contacto com superfícies contaminadas e o processamento ou armazenamento inadequado (Camargo, Carvalho De Souza e Marquez, 2017).

Perigos físicos

Os perigos físicos nos alimentos são relativos a materiais estranhos ao alimento. Podem ser cabelos, fragmentos metálicos, pedaços de plástico, vidro e madeira. No entanto, existem situações em que o perigo físico é inevitável, como por exemplo, espinhas, ossos e sementes de frutas. Para prevenir esta situação as inspeções de rotina dos equipamentos e materiais são muito importantes (Batt, 2016).

Estes perigos podem causar quebra de dentes, lesões orais, lesões no esófago, abdómen ou outros órgãos do sistema digestivo (Aguiar *et al.*, 2018; Kenner, 2001).

Perigos químicos

Tal como os perigos físicos, também os perigos químicos são associados a matérias-primas, ingredientes e práticas de colaboradores. No entanto, são muito mais difíceis de detetar e excluir de um processo de fabricação (Kenner, 2001).

Os alimentos podem ser contaminados por produtos químicos em diferentes fases da cadeia de produção: produção primária, processamento industrial, retalho e consumidor. Algumas das classes mais importantes incluem contaminantes como micotoxinas, metais pesados, acrilamida e BPA, resíduos de pesticidas, medicamentos veterinários e aditivos alimentares. Outros produtos químicos usados para adulterar os alimentos, como melamina e corantes, também podem causar problemas de segurança alimentar (Arisseto-Bragotto, Feltes e Block, 2017).

A exposição prolongada é altamente preocupante, uma vez que as substâncias podem apresentar potencial carcinogénico, mutagénico e teratogénico, podendo originar doenças crónicas e sérios riscos à saúde humana (Arisseto-Bragotto, Feltes e Block, 2017).

Perigos biológicos

Os perigos biológicos estão associados aos microrganismos, que são responsáveis por cerca de 90% das doenças que são transmitidas por alimentos. Estes podem ser encontrados na grande maioria dos alimentos, e a transmissão resulta, maioritariamente, do uso de metodologias erradas nas últimas etapas da sua confeção ou distribuição (ASAE, 2018).

Os microrganismos podem ser classificados de acordo com o seu perigo e difusão: risco severo; risco moderado e alta difusão; risco moderado e difusão limitada (Tabela 2) (ASAE, 2018).

Tabela 2 Classificação dos microrganismos de acordo com o seu perigo e difusão (Adaptado de ASAE, 2018)

Risco severo	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 spp.</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i> A, B	<i>Shigella spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
Vírus das hepatites A e E	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EEC)	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Vibrio Cholerae non-01</i>
<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>

Bactérias

As bactérias são microrganismos unicelulares procariotas, que se caracterizam por apresentarem uma estrutura muito simples.

Na presença de nutrientes, temperatura, pH, humidade e concentração de oxigénio adequados, podem replicar-se muito rapidamente, sendo que em alguns casos 20 minutos são suficientes para que o número de bactéria duplique (Tabela 3)(ASAE, 2018).

Tabela 3 Bactérias associadas a doenças transmitidas por alimentos (Adaptado de ASAE, 2018)

Género	Espécies / Estirpes	Alimentos mais frequentemente associados	Práticas inadequadas	Alimentos notificados no RASFF* (março 2005 - agosto 2006)
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>	Arroz, cereais, pratos de carne, vegetais	Alimentos que tenham tido 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 Lacticínios	Alimentos proteicos pouco cozinhados	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>		Manuseamento inadequado; Refrigeração lenta; Alimentos aquecidos a baixa temperatura	
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	Água ou alimentos com contaminação fecal		Carne de vaca, chá de limão, queijo brie, mexilhão, salame, produtos à base de leite
<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Leite Derivados do leite Saladas		Bacon, carne de cavalo, carne de vaca cozinhada, filetes, linguiça, paté, queijo de leite cru, queijo fumado, peixe, salame, salmão fumado, sushi
<i>Salmonella</i>	<i>S. Enteritidis</i> <i>S. typhimurium</i>	Frango, pato, peru e ovos		Carne porco, Carne vaca, Codornizes, Frango, Pato, Peru, Ovos
<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae</i>	Saladas, Leite, Aves Produtos hortícolas		
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	Carne, Leite, Ovos e derivados Resulta da manipulação		Marisco Peixe Queijo de leite cru

		Alimentos ricos em proteína e água		
<i>Streptococcus</i>	<i>S. pyogenes</i>	Leite cru, gelados, saladas, mariscos		
<i>Vibrio</i>	<i>V. cholerae</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i>	Peixe, marisco e moluscos crus ou insuficientemente cozinhados		Camarão
	<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

Vírus

Os vírus são agentes infecciosos com uma organização acelular simples, apresentam uma ou várias moléculas de ácidos nucleicos cobertas por proteínas, podendo apresentar um complexo envelope externo com espículas. Caracterizam-se por serem de tamanho inferior às bactérias e necessitam de uma célula viva para se poderem multiplicar. A célula viva deve ser de uma espécie para a qual são específicos, sendo assim a célula um hospedeiro. Os vírus podem ser causadores de doenças de origem alimentar, principalmente quando os alimentos não são devidamente cozinhados. Dentro do contexto alimentar os mais frequentes são os da hepatite A e da hepatite E, os rotavírus e os vírus da família Norwalk. (ASAE, 2018).

Parasitas

Os parasitas são organismos que vivem à superfície ou interior de outro organismo, classificado como hospedeiro, dependendo do mesmo para obter os nutrientes necessários à sua sobrevivência. Os parasitas podem ainda ser divididos em dois grupos, os protozoários e os helmintas.

Os parasitas caracterizam-se por serem maiores do que as bactérias, podendo crescer e atingir o estado adulto no trato gastrointestinal do homem. Os sintomas podem durar várias semanas ao fim das quais diminuem ou desaparecem, e em alguns casos podem, posteriormente, reaparecer. Entre os principais parasitas causadores de Doenças Origem Alimentar destacam-se os protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* e os helmintas *Trichinella spiralis* (nemátoda) (Tabela 4) (ASAE, 2018).

Tabela 4 Parasitas envolvidos em Doenças de Origem Alimentar (Adaptado de ASAE, 2018)

Género	Tipo	Espécies	Alimentos mais frequentemente associados	Alimentos notificados no RASFF* (março - agosto 2006)
<i>Cryptosporidium</i>	Protozoário	<i>C. parvum</i>	Leite, Água, Vegetais	
<i>Giardia</i>	Protozoário	<i>G. lamblia</i> (ou <i>G. duodenalis</i> ou <i>G. intestinalis</i>)	Alimentos ou águas expostas a contaminação fecal	
<i>Cyclospora</i>	Protozoário	<i>C. cayetanensis</i>	Água e alimentos contaminados com fezes	
<i>Entamoeba</i>	Protozoário	<i>E. histolytica</i>	Água, frutos e vegetais	
<i>Ascaris</i>	Helminta	<i>A. lumbricoides</i>		
<i>Anisakis</i>	Helminta	<i>A. simplex</i>	Salmão, Bacalhau, Badejo, Arenques, etc. Esta larva encontra-se no músculo de muitos peixes	Bacalhau seco Sardas Tamboril
<i>Taenia</i>	Helminta	<i>T. saginata</i> <i>T. solium</i>	Bovinos Porco	
<i>Trichinella</i>	Helminta	<i>T. spiralis</i>	Javali Porco Músculo de animais carnívoros	
<i>Diphyllobothrium</i>	Helminta		Salmão Outros peixes	

* RASFF- Rapid Alert System for Food and Feed

Fatores associados aos parasitas, e aos hospedeiros contribuem para a ocorrência de parasitoses com origem alimentar. Entre estes fatores destacam-se a variabilidade da expressão de mecanismos patogénicos, o potencial de causar doença, a dose infetante, e a natureza das interações parasita-hospedeiro bem como com outros microrganismos. A dose infetante corresponde ao número mínimo de microrganismos necessários para causar a infeção. A dose infetante pode variar de acordo com o indivíduo, tendo em conta a existência

de grupos de risco, que podem contrair uma doença quando expostos a um número menor de microrganismos patogénicos do que o necessário para causar doença num adulto saudável. Existem outras variáveis relacionadas com o hospedeiro como a idade, o estado físico e de saúde em geral, doenças, estado nutricional e distúrbios genéticos que determinam o estabelecimento das parasitoses (Baptista e Venâncio, 2003).

1.3. Saladas: benefícios e causas de contaminação

As frutas e os vegetais são muito importantes numa alimentação saudável devido aos seus benefícios nutricionais. O seu consumo regular é recomendado por comunidades internacionais de nutrição e saúde. Os legumes são fontes ricas de vitaminas, minerais, fibras alimentares e polifenóis, e a sua ingestão regular ajuda a reduzir o risco de doenças crónicas como diabetes, acidente vascular cerebral, doenças cardiovasculares e aterosclerose (Fallah, Makhtumi e Pirali-Kheirabadi, 2016).

Contudo, o consumo de frutas e vegetais crus sem a correta lavagem ou descascamento representa um grande risco para a disseminação de infeções. A crescente procura destes alimentos, a globalização e o seu fácil transporte aumentou a probabilidade de contaminação e a sobrevivência dos estádios dos parasitas responsáveis pela transmissão ao homem (Kozan et al., 2005).

A contaminação pode ocorrer devido ao uso de efluentes de esgoto para fins de irrigação, aplicação de fezes de animais como fertilizantes e a falta de saneamento ou de higiene pessoal nos locais onde se manipulam estes alimentos (Amahmid, Asmama e Bouhoum, 1999; Beuchat, 2002; Kozan et al., 2005).

Os ooquistos, quistos, ovos e larvas dos parasitas são muito resistentes às condições ambientais, podendo permanecer viáveis por longos períodos de tempo na água, solo e nas culturas (Shuval, Yekutieli e Fattal, 1985).

A contaminação fecal dos alimentos que são ingeridos crus e sem nenhum processamento térmico, constitui um fator importante na epidemiologia das parasitoses (Shuval, Yekutieli e Fattal, 1985).

1.4. *Giardia lamblia* e giardíase

Giardia lamblia é um parasita protozoário flagelado que pertence ao Filo *Sarcomastigophora*, classe *Zoomastigophora*, ordem *Diplomonadida*, família *Hexamitidae*. O seu habitat é o intestino delgado e é o agente etiológico da doença diarreica denominada de giardíase. Este agente patogénico pode ter muitos hospedeiros, incluindo animais domésticos, selvagens e seres humanos (Plutzer, Ongerth e Karanis, 2010; Thompson, Hopkins e Homan, 2000).

Giardia lamblia é responsável por 200 milhões de indivíduos sintomáticos em todo o mundo apresentando uma prevalência de 2 a 5% nos países industrializados e de 20 a 30% nos países em desenvolvimento (Bouzid, Steverding e Tyler, 2008).

Atualmente, o género *Giardia* é dividido em oito espécies, cada uma com os seus hospedeiros, sendo que a única que afeta o homem é *Giardia lamblia* (Tabela 5) (Lyu et al., 2018).

Tabela 5 Espécies de *Giardia* e os seus hospedeiros (Adaptado de Lyu et al., 2018)

Espécie	Hospedeiro
<i>Giardia lamblia</i>	Homem e outros mamíferos
<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
<i>Giardia peramelis</i>	Bandicoots australianos
<i>Giardia cricetarum</i>	Hamsters

Giardia lamblia é uma espécie complexa, com oito genótipos, de A a H, mas apenas os genótipos A e B foram detetados nos seres humanos (Tabela 6)(Bouzid, Steverding e Tyler, 2008; Lasek-Nesselquist, Welch e Sogin, 2010; Sprong, Cacciò e Giessen, Van Der, 2009)

Tabela 6 Genótipos de *Giardia lamblia* e os seus hospedeiros (Adaptado de Lasek-Nesselquist, Welch e Sogin, 2010)

Genótipo	Hospedeiro
A	Humanos, primatas, cão, gado, cavalo, gato, porco, veado, alce, castor
B	Humanos, primatas, cão, gado, cavalo, coiole, chinchila, castor, rato
C	Cão e outros canídeos
D	Cão e outros canídeos
E	Gado
F	Gato
G	Rato
H	Mamíferos marinhos

G. lamblia tem duas formas evolutivas no seu ciclo de vida, o trofozoíto e o quisto. O trofozoíto caracteriza-se por ser uma forma metabolicamente muito ativa, na qual ocorre a alimentação e a reprodução. Apresenta um formato de pera, com aproximadamente 8 a 18 µm de comprimento e 5 a 15 µm de largura, possui dois núcleos e quatro pares de flagelos. O quisto é uma forma de resistência, apresentando formato oval com aproximadamente 8 a 12 µm de comprimento, 7 a 10 µm de largura e uma parede de 0,3 a 0,5 µm de espessura, possuindo quatro núcleos (Adam, 2001; Heresi *et al.*, 2000; Sagayar, 1997; USEPA, 2005; Wolfe, 1992).

G. lamblia tem um ciclo de vida monoxeno alternando entre os dois estádios (Figura 2). O estágio infeccioso é o quisto que é eliminado nas fezes do hospedeiro. O quisto ao ser ingerido pelo hospedeiro, através de águas e alimentos contaminados, é exposto à ação do ácido estomacal e sais biliares que estimulam o desenquistamento, ou seja, a libertação de trofozoítos. Os trofozoítos aderem e colonizam a superfície do intestino delgado. À medida que os trofozoítos são arrastados pelos movimentos peristálticos, enquistam e são eliminados nas fezes (Monis e Thompson, 2003).

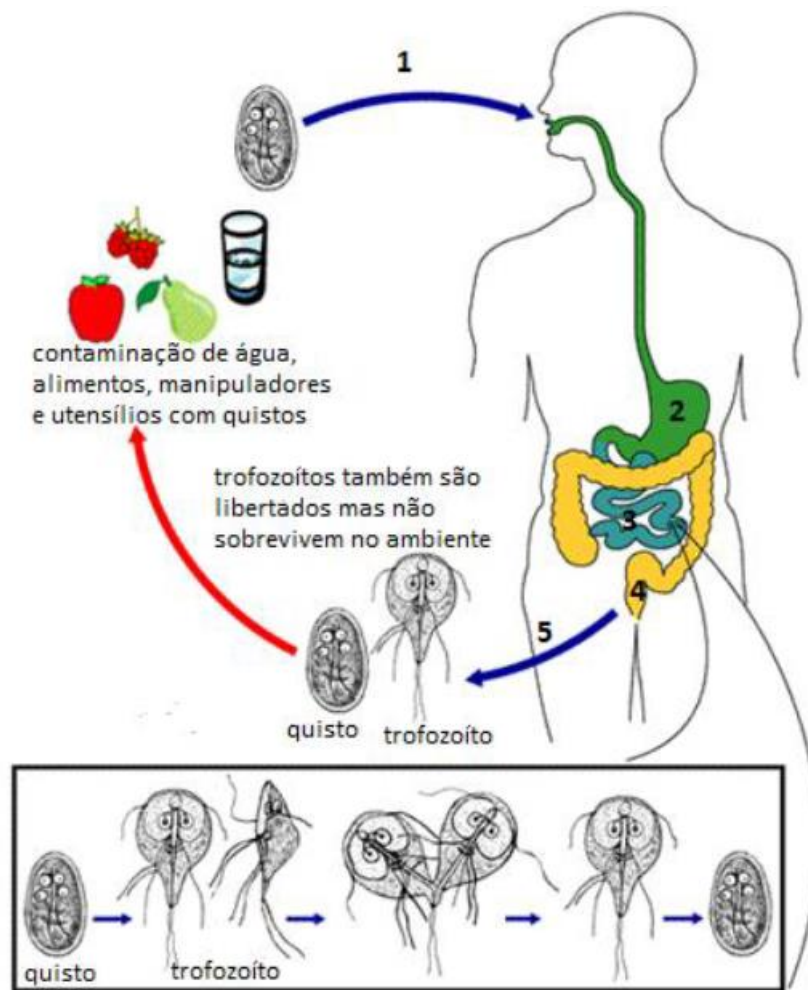


Figura 2 Ciclo de vida de *Giardia* (adaptado de <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>)

A infecção por *G. lamblia* é na maioria das vezes assintomática. Contudo, a giardíase pode ser responsável por diarreia aguda ou crônica, dor abdominal, perda de peso, náusea, dor de cabeça, flatulência e síndrome de má absorção (Faubert, 2000; Thompson, 2004).

O diagnóstico clínico nem sempre é fácil uma vez que os sintomas são semelhantes a várias outras doenças gastrointestinais. Os sintomas também podem variar de acordo com o estágio do ciclo de vida do parasita. O período de incubação pode durar de 12 a 19 dias e é marcado pela primeira detecção de quistos nas fezes (Faubert, 2000).

Algumas das medidas de profilaxia recomendadas passam pela higiene pessoal, destino adequado das fezes, proteção dos alimentos e tratamento da água para destruir os quistos (Neves *et al.*, 2005).

1.5. *Cryptosporidium* sp. e criptosporidiose

Cryptosporidium spp. é responsável por causar doenças diarreicas significativas em humanos e animais em todo o mundo. *Cryptosporidium* spp. pertence ao filo Apicomplexa, que inclui outros importantes patógenos de importância médica e veterinária como *Plasmodium* spp., responsável pela malária, e *Toxoplasma gondii* responsável pela toxoplasmose.

Os parasitas intracelulares do género *Cryptosporidium* infetam mamíferos, aves, répteis e anfíbios. A criptosporidiose é comumente uma doença autolimitada em hospedeiros saudáveis, mas representa uma doença com risco de vida em indivíduos imunocomprometidos e crianças, para os quais não há tratamento eficaz. (Šlapeta, 2013)

A infeção por *Cryptosporidium* é encontrada em todos os continentes, ocorrendo com uma prevalência de 0,6 a 20% em países desenvolvidos e 4 a 32% em países em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos, muitos surtos são associados à contaminação hídrica (Rey, 2008).

A prevalência da criptosporidiose também varia de acordo com fatores como a idade, hábitos e costumes das populações, época do ano, área geográfica, densidade populacional, estado nutricional da população e o estado imune dos indivíduos (Neves et al., 2005).

Atualmente estão descritas 26 espécies e mais de 40 genótipos para o género *Cryptosporidium*, sendo só algumas reconhecidas como possíveis agentes de doença no homem (Tabela 7).

As espécies mais identificadas em estudos epidemiológicos são *C. hominis* e *C. parvum*, sendo a prevalência de ambas espécies variáveis em diferentes partes do mundo. *C. parvum* tem maior frequência na Europa, enquanto *C. hominis* tem maior frequência na América do Norte, América do Sul, Austrália e África (Savoli et al., 2006; Xiao, 2010; Ren et al., 2012).

Tabela 7 Exemplos de algumas espécies de *Cryptosporidium* e os seus hospedeiros (Adaptado de (Fayer, 2010; Xiao et al., 1999))

Espécies	Hospedeiros
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Cobra do milho
<i>Cryptosporidium varanii</i>	Lagarto-esmeralda
<i>Cryptosporidium fragile</i>	<i>Duttaphrynus melanostictus</i>
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Peru selvagem
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Galo
<i>Cryptosporidium galli</i>	Galo
<i>Cryptosporidium muris</i>	Rato
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Rato e humanos
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Porquinho-da-índia

<i>Cryptosporidium felis</i>	Gato
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Gado bovino
<i>Cryptosporidium canis</i>	Cão
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Humanos
<i>Cryptosporidium suis</i>	Porco
<i>Cryptosporidium bovis</i>	Gado bovino
<i>Cryptosporidium fayeri</i>	Canguru
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	Gado bovino
<i>Cryptosporidium macropodum</i>	Canguru cinza oriental

O ciclo de vida de *Cryptosporidium* é completado em um único hospedeiro e culmina com a eliminação de ooquistos esporulados através das fezes e, possivelmente, por outras vias como nas secreções respiratórias. Os ooquistos têm 4 esporozoítos, cerca de 4-6 µm em diâmetro e são imediatamente infecciosos para outro hospedeiro suscetível.

A transmissão zoonótica de *C. parvum* ocorre através do contato com animais infetados ou pela exposição a água contaminada por fezes de animais. A transmissão antroponótica de *C. parvum* e *C. hominis* ocorre através da exposição a água contaminada por fezes humanas ou através do contacto direto homem-homem. Após a ingestão (e possivelmente inalação) do ooquisto por um hospedeiro adequado, ocorre a excitação no intestino delgado, libertando os esporozoítos (Figura 3). Os esporozoítos parasitam células epiteliais do trato gastrointestinal ou de outros tecidos, como o trato respiratório. Nestas células, os parasitas sofrem multiplicação assexuada e depois multiplicação sexuada produzindo microgametócito e macrogametócito. Após a fertilização dos macrogâmetas pelos microgâmetas formam-se os zigotos, que posteriormente se diferenciam em ooquistos que esporulam ainda no interior do hospedeiro infetado. Dois tipos diferentes de ooquistos são produzidos, o ooquisto de parede espessa, que é comumente excretado nas fezes do hospedeiro, e o ooquisto de parede fina, que está principalmente envolvido nos processos de autoinfecção. Os ooquistos são infetantes na excreção, permitindo assim a transmissão fecal-oral direta e imediata (Figura 3) (CDC, 2021; Dawson, 2005).

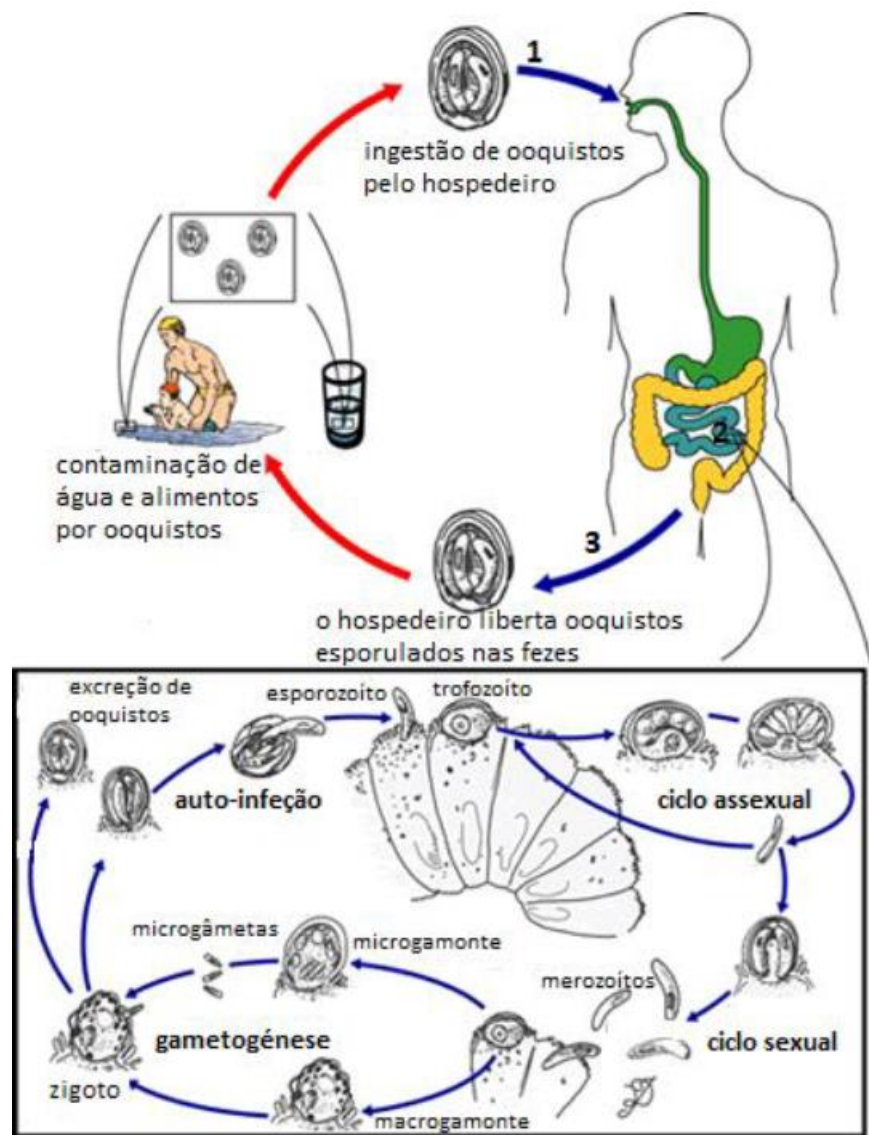


Figura 3 Ciclo de vida de *Cryptosporidium* sp. (Adaptado de CDC, 2021)

Os sintomas da criptosporidiose estão associados a alterações na mucosa gastrointestinal, diarreia aquosa, anorexia, dor abdominal, náusea, flatulência, febre, perda de peso e dor de cabeça (Neves *et al.*, 2005). Como medidas de profilaxia, devem ser adotadas medidas que previnam ou evitem a contaminação do meio ambiente, água e alimentos com ooquistos do parasita, e devem ser adotados cuidados de higiene pessoal (Neves *et al.*, 2005).

Tendo em conta que as saladas são um alimento essencial para uma boa qualidade de vida e que são consumidas sem nenhum processamento culinário, é importante saber se as saladas se encontram livres de microrganismos patogênicos, em particular as pré-embaladas uma vez que, supostamente, estão prontas a consumir. É, portanto, proposto neste trabalho pesquisar a presença dos parasitas *Giardia* e *Cryptosporidium*, a fim de avaliar a segurança em consumir as saladas pré-embaladas sem qualquer procedimento prévio.

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos

Este trabalho de investigação teve como objetivo a deteção molecular dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* em saladas embaladas prontas a consumir de forma a avaliarmos a segurança deste alimento. Para isso foi realizada a deteção através do nested-PCR e posteriormente a identificação da espécie e/ou genótipo por sequenciação.

As saladas analisadas foram de agrião, alface frisada, rúcula selvagem e salada ibérica (mistura de rúcula selvagem, alface verde e alface roxa).

Tendo em conta o objetivo referido, foi elaborado um plano de trabalho com os seguintes objetivos específicos:

- Deteção de *Giardia* em saladas pré-embaladas prontas a consumir através das técnicas de biologia molecular nested-PCR.
- Deteção de *Cryptosporidium sp.* em saladas pré-embaladas prontas a consumir através das técnicas de biologia molecular nested-PCR.
- Caracterização das espécies/genótipos de *Giardia* 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 foram compradas no supermercado Pingo Doce de Viseu e de Coimbra, durante um período de 6 meses, de setembro de 2021 até fevereiro de 2022. As saladas analisadas foram as pré-embaladas, prontas para consumo, da marca Pingo Doce e de quatro variedades diferentes: salada ibérica, rúcula selvagem, alface frisada e agrião. No total foram analisadas 40 amostras (Tabela 8).

Tabela 8 Identificação e caracterização das amostras

Amostra	Lote	Data de processamento	Data de validade	Composição
AP4	L- 11009935	13/10/2021	16/10/2021	Agrião
IP4	L- 1640	13/10/2021	15/10/2021	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem
FP4	L- 110099049	13/10/2021	16/10/2021	Alface frisada
RP4	280S414	13/10/2021	14/10/2021	Rúcula selvagem
AP5	L- 285S422	13/10/2021	19/10/2021	Agrião
IP5	L- 1441	13/10/2021	20/10/2021	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem
FP5	L- 4GPD12890	13/10/2021	22/10/2021	Alface frisada
RP5	L- 310A13071435	13/10/2021	23/10/2021	Rúcula selvagem
AP6	L- 110169035	22/10/2021	23/10/2021	Agrião
IP6	L- 292S432	22/10/2021	26/10/2021	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem
FP6	L- 4GPD12930	22/10/2021	26/10/2021	Alface frisada
RP6	L- 288S425	22/10/2021	22/10/2021	Rúcula selvagem
AP7	L- 301S444	27/10/2021	4/11/2021	Agrião
IP7	L- 301S444	27/10/2021	4/11/2021	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem
FP7	L- 301S444	27/10/2021	4/11/2021	Alface frisada
RP7	L- 301S444	27/10/2021	4/11/2021	Rúcula selvagem
AP8	L- 309S455	3/11/2021	12/11/2021	Agrião

IP8	L- 111059082	3/11/2021	12/11/2021	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem
FP8	L- 111049049	3/11/2021	11/11/2021	Alface frisada
RP8	L- 308S454	3/11/2021	11/11/2021	Rúcula selvagem
AP9	L-1254	11/11/2021	15/11/2021	Agrião
IP9	L-111089082	11/11/2021	15/11/2021	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem
FP9	L-4GPD13131	11/11/2021	15/11/2021	Alface frisada
RP9	L-1644	11/11/2021	12/11/2021	Rúcula selvagem
API0	L-111099035	15/11/2021	16/11/2021	Agrião
IPI0	L-314S483	15/11/2021	17/11/2021	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem
FPI0	L-314S463	15/11/2021	17/11/2021	Alface frisada
RPI0	L-111109121	15/11/2021	17/11/2021	Rúcula selvagem
API1	L-2601	11/01/2022	14/01/2022	Agrião
IPI1	L-005S013	11/01/2022	12/01/2022	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem
FPI1	L-4GPD00081	11/01/2022	14/01/2022	Alface frisada
RPI1	L-301A07071546	11/01/2022	17/01/2022	Rúcula selvagem
API2	L-201149035	18/01/2022	21/01/2022	Agrião
IPI2	L- 014S025	18/01/2022	21/01/2022	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem
FPI2	L- 201129049	18/01/2022	19/01/2022	Alface frisada
RP12	L- 201149121	18/01/2022	21/01/2022	Rúcula selvagem
API3	L-012S023	18/01/2022	19/01/2022	Agrião
IPI3	L-014S025	18/01/2022	21/01/2022	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem
FPI3	L-201129049	18/01/2022	19/01/2022	Alface frisada
RP13	L-201129121	18/01/2022	21/01/2022	Rúcula selvagem

O processamento das amostras foi realizado em condições de assepsia e dentro do prazo de validade das saladas. Uma porção de 25g de cada salada foi colocada num erlenmeyer com tampa (1L), no qual foi adicionado 200mL 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 120rpm. Após a agitação o conteúdo foi filtrado através de duas camadas de gaze em coadores de plástico e o líquido foi transferido para quatro tubos de

falcon (50mL). Depois ajustou-se o volume do filtrado com solução salina e centrifugou-se a 5000rpm durante 10 minutos a 4°C (centrífuga *Sigma 3-18K*). O sobrenadante foi rejeitado e repetiu-se a centrifugação após ressuspensão do sedimento em solução salina. O sobrenadante foi novamente rejeitado e os sedimentos dos quatro tubos foram transferidos para um tubo de microcentrífuga (1,5mL) e centrifugado a 10,000 x g durante 10 minutos (centrífuga *Biofuge 13, Heraeus sepatech*). O sobrenadante foi descartado e o sedimento armazenado a 4°C até extração do ADN total.

3.2. Extração de ADN total

A extração do ADN foi realizada utilizando-se o kit comercial *NZY Tissue gDNA Isolation Kit (nzytech)* com algumas adaptações.

Ao sedimento das amostras foram adicionadas 0,2g de pérolas de vidro (0,5mm, *BioSpec Products, Inc.*), 180µL do tampão NT1, 20µL de uma solução de polivinilpirrolidona (10%) e 25µL de proteinase K. Agitou-se a mistura no vortex por 3 minutos e foi incubada a 56°C durante 1 hora. Durante a incubação, de 15 em 15 minutos, as amostras foram agitadas no vortex durante 10 segundos. Após a incubação adicionou-se 200µL do tampão NL, agitou-se no vortex e adicionou-se 210µL de etanol absoluto. Após nova agitação no vortex, o lisado foi transferido para uma coluna *NZY Spin Tissue Column*, previamente colocada num tubo coletor, e centrifugou-se a 11,000 x g durante 1 minuto (centrífuga *Biofuge 13, Heraeus sepatech*). O tubo coletor contendo o filtrado foi descartado e a coluna foi colocada num novo tubo coletor. Adicionou-se à coluna 500µL do tampão NW1 e centrifugou-se a 11,000 x g durante 1 minuto. O tubo coletor foi novamente descartado, a coluna colocada num novo tubo coletor, adicionou-se 600µL do tampão NW2 e centrifugou-se a 11,000 x g durante 1 minuto. Em seguida descartou-se novamente o tubo coletor e a coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga ao qual se adicionou 200µL do tampão NE, incubou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugou-se a 11,000 x g durante 2 minutos para eluição do ADN.

Os tubos de microcentrífuga contendo o ADN purificado foram armazenados a -20°C.

3.3. Nested-PCR

3.3.1. *Giardia lamblia*

O ADN extraído foi analisado por nested-PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos do gene da subunidade menor do ARN ribossomal (*ssu rRNA*) de *G. lamblia* (Appelbee *et al.*, 2003; Hopkins *et al.*, 1997).

Foram realizadas duas reações, a primeira reação de amplificação foi realizada com o par de oligonucleotídeos *Gia2029* e *Gia2150c* e a segunda com o par de oligonucleotídeos *RH11* e *RH4* (Tabela 9). A primeira reação produz um fragmento de 497pb e a segunda de 292pb.

Tabela 9 Oligonucleotídeos sintéticos utilizados nas reações nested-PCR para detecção de *Giardia lamblia*

Gene	Oligonucl eotídeo	Sequência (5'-3')	Fragment o (p.b.)	Referências
<i>ssu rRNA</i>	<i>Gia2029</i>	AAGTGTGGTGCAGACGGACTC	497	(Appelbee <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Gia2150c</i>	CTGCTGCCGTCCTTGGATGT		
	<i>RH11</i>	CATCCGGTCGATCCTGCC	292	(Hopkins <i>et al.</i> , 1997)
	<i>RH4</i>	AGTCGAACCCTGATTCTCCGACCA GG		

As reações foram realizadas para um volume final de 25µL, com 12,5µL de *PCR Mix Plus* (A&A Biotechnology), 1,25µL de cada oligonucleotídeo (10µM), 1,25µL de dimetilsulfóxido (DMSO), 5µL do ADN extraído, para a primeira reação de PCR, ou 1µL do produto amplificado na primeira reação, para a segunda reação de PCR, e água estéril de modo a perfazer o volume final de 25 µL (Tabela 10).

As amplificações foram realizadas no *MJ Mini Personal Thermal Cycler*. Na primeira reação de amplificação utilizou-se um ciclo de desnaturação inicial a 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, e um ciclo final a 72°C durante 4 minutos. Em relação à segunda reação de amplificação, as condições foram iguais, exceto a temperatura de *annealing* que foi de 59°C. Além das amostras em estudo foram incluídos controlos positivos (ADN de *G. lamblia* WBC6) e controlos negativos (água estéril).

Tabela 10 Composição da mistura utilizada no nested-PCR para detecção de *Giardia*.

Reagentes	Quantidade (µL)	
	1ª reação PCR	2ª reação PCR
PCR Mix Plus (A&A Biotechnology)	12,5	12,5
Oligonucleotídeo senso	1,25	1,25
Oligonucleotídeo antisenso	1,25	1,25
DMSO	1,25	1,25
Água estéril	3,75	7,75
ADN (amostra)	5	1
Volume final	25	25

3.3.2. *Cryptosporidium sp.*

O ADN extraído foi analisado por nested-PCR, utilizando-se oligonucleotídeos para o gene da subunidade menor 18S do RNA ribossomal (*ssu rRNA*) (Xiao et al., 1999).

Foram realizadas duas reações, a primeira reação de amplificação foi realizada com o par de oligonucleotídeos *Crypto 18SF1* e *Crypto 18SR1* e a segunda com o par de oligonucleotídeos *Crypto 18SF2* e *Crypto 18SR2* (Tabela 11). A primeira reação produziu um fragmento de 1325pb e a segunda de 825pb.

Tabela 11 Oligonucleotídeos sintéticos utilizados nas reações de nested-PCR para detecção de *Cryptosporidium sp.*

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Fragmento (p.b.)	Referências
<i>ssu rRNA</i>	<i>18SF1</i>	TTCTAGAGCTAATACATGC G	1325	(Xiao et al., 1999)
	<i>18SR1</i>	CCCTAATCCTTCGAAACAG GA		
	<i>18SF2</i>	GGAAGGGTTGTATTTATTAG ATAAAG	825	
	<i>18SR2</i>	AAGGAGTAAGGAACAACCT CCA		

As reações foram realizadas para um volume final de 25µL, com 12,5µL de *PCR Mix Plus* (A&A Biotechnology), 1,25µL de cada oligonucleotídeo (10µM), 3µL de albumina de soro bovino (BSA) (2mg/ml), 5µL do ADN extraído, para a primeira reação de PCR, ou 1µL do produto amplificado, na primeira reação, para a segunda reação de PCR, e água estéril de modo a perfazer o volume final de 25µL (Tabela 12). As amplificações foram realizadas no *MJ Mini Personal Thermal Cycler*.

Na primeira reação de amplificação utilizou-se um ciclo de desnaturação inicial a 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, e um ciclo final a 72°C durante 7 minutos. Na segunda reação de amplificação utilizou-se um ciclo de desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, 40 ciclos de amplificação a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 90 segundos e 72°C durante 60 segundos e um ciclo final a 72°C durante 7 minutos.

Além das amostras em estudo foram incluídos controlos positivos (ADN de *Cryptosporidium sp.*) e controlos negativos (água estéril).

Tabela 12 Composição da mistura utilizada na reação de nested-PCR para deteção de *Cryptosporidium sp.*

Reagentes	Quantidade (µL)	
	1ª reação	2ª reação
<i>PCR Mix Plus</i> (A&A Biotechnology)	12,5	12,5
Oligonucleotídeo senso	1	1
Oligonucleotídeo antisenso	1	1
BSA	3	3
Água estéril	2,50	6,5
ADN (amostra)	5	1
Volume final	25	25

3.4. Eletroforese e visualização dos fragmentos de ADN amplificados no nested-PCR

A eletroforese dos fragmentos de ADN amplificados no nested-PCR foi realizada em gel de agarose. Na eletroforese dos amplicões de *Giardia*, o gel de agarose foi preparado a 1,2%, contendo 0,48g de agarose, 40mL do tampão Tris ácido bórico e EDTA (TBE) (1%) e 2µL de brometo de etídeo.

Na eletroforese dos amplicões de *Cryptosporidium sp.*, o gel de agarose foi preparado a 0,9%, contendo 0,36g, 40mL do tampão Tris ácido bórico e EDTA (TBE) (1%) e 2µL de brometo de etídeo.

Os produtos amplificados (20µL) foram aplicados nos poços do gel de agarose, bem como o marcador de massa molecular *NzyDNA Ladder VI* (*Nzytech*) de forma a identificar o tamanho dos fragmentos amplificados.

A electroforese foi realizada a 80V durante 1 hora, no tampão de corrida TBE (0,5%).

Na etapa final, o gel foi visualizado e fotografado sobre luz ultravioleta, utilizando-se o transluminador *Vilbert Lourmat*.

3.5. Purificação dos produtos de PCR e sequenciação

Os amplicões foram purificados através do *illustra ExoProStar 1-Step* para posterior sequenciação. A 5µL da 2ª reação de PCR foi adicionado 2µL de *illustra ExoProStar 1-Step* e incubou-se a 37°C por 15 minutos e depois a 80°C por 15 minutos para inativar as enzimas. A incubação foi realizada no *MJ Mini Personal Thermal Cycler*. Depois da incubação retirou-se 5µL da mistura e adicionou-se 5µL de um dos oligonucleotídeos da segunda reação de nested-PCR e esta mistura foi enviada para os serviços de sequenciação.

Em determinadas situações, como a amplificação de bandas inespecíficas e *smears*, as bandas de ADN de interesse foram cortadas do gel e posteriormente purificadas utilizando-se o kit *Gel-Out Kit for DNA extraction from agarose* (*A&A Biotechnology*) segundo as instruções do fabricante. O gel cortado foi transferido para tubos de *Eppendorf*, adicionou-se 400µL de *R7SI* e incubou-se a 50°C até à dissolução completa da agarose. As amostras foram misturadas invertendo os tubos e/ou utilizando o vortex algumas vezes. Posteriormente foram adicionados 200µL de isopropanol e as amostras foram agitadas. As amostras foram depois centrifugadas para remover restos de solução que estivessem nas paredes e topo do tubo. Posteriormente, as amostras foram transferidas para as mini colunas e centrifugadas durante 30 segundos entre 10000-15000 RPM. As mini colunas foram removidas dos tubos, os filtrados foram descartados e as mini colunas foram colocadas nos tubos coletores. Foram adicionados 600µL de *AI wash solution* e centrifugou-se durante 30 segundos a 10000-15000 RPM. As mini colunas foram removidas dos tubos, os filtrados foram descartados e as mini colunas foram colocadas novamente nos tubos coletores. Foram adicionados 300µL de *AI wash solution* e centrifugou-se durante 2 minutos a 10000-15000 RPM. Depois as mini colunas secas foram transferidas para novos tubos para se fazer a eluição dos produtos. Para tal, adicionou-se 50µL de *TE buffer* diretamente para as mini colunas, incubou-se durante 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se durante 1 minuto a 10000-

15000 RPM. As mini colunas foram rejeitadas e o eluído com o ADN purificado foi guardado entre 4°C a 8°C.

Os produtos de PCR e/ou bandas purificadas diretamente do gel foram enviadas para sequenciação. As cadeias de ADN foram sequenciadas pelo método dos terminadores de cadeia automatizado, em ambos os sentidos. As sequências nucleotídicas obtidas para cada amostra foram analisadas através do programa *BioEdit* e alinhadas com recurso ao programa *MEGA* versão 6. O programa *BLAST* foi utilizado para comparar as sequências obtidas com as sequências disponíveis no *GenBank*.

Capítulo 4

Resultados

4. Resultados

4.1. Detecção de *Giardia lamblia* por nested-PCR

O nested-PCR amplificou fragmentos de 292pb do gene *ssu rRNA* controlo positivo *Giardia lamblia* (WBC6) (Figura 4).

Na Tabela 13 apresentam-se os resultados obtidos no nested-PCR das amostras analisadas. Nenhuma amostra de salada em estudo apresentou a amplificação específica de *G. lamblia*.

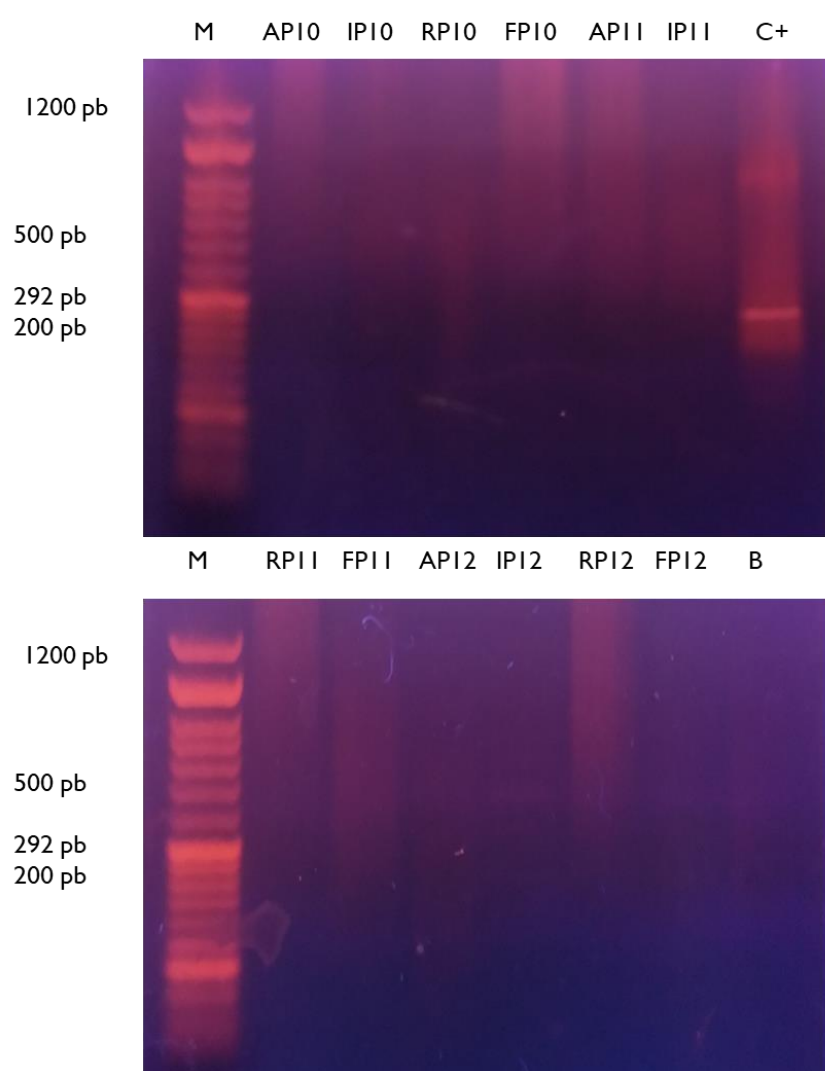


Figura 4 Separação eletroforética em gel de agarose a 1,2% e coloração de brometo de etídeo dos produtos do nested-PCR do gene *ssu rRNA* de *Giardia lamblia*. (M: marcador de massa molecular NzyDNA Ladder VI (Nzytech); C+: controlo positivo; B: controlo negativo; API0, IPI0, RPI0, FPI0, API1, IPI1, RPI1, FPI1, API2, IPI2, RPI2 e FPI2: amostras)

Tabela 13 Detecção de *Giardia lamblia* por nested-PCR

Amostras	Nested-PCR
AP4, IP4, FP4, RP4, AP5, IP5, FP5, RP5, AP6, IP6, FP6, RP6, AP7, IP7, FP7, RP7, AP8, IP8, FP8, RP8, AP9, IP9, FP9, RP9, AP10, IP10, FP10, RP10, AP11, IP11, FP11, RP11, AP12, IP12, FP12, RP12, AP13, IP13, FP13, RP13	Negativo
Controlo negativo	-
Controlo positivo	+

4.2. Detecção de *Cryptosporidium sp.* por nested-PCR

O nested-PCR amplificou o fragmento de 825pb do gene *ssu RNA* nas amostras controlo positivo de *Cryptosporidium sp.* (Figura 5).

Em algumas amostras, FP5, IP7, FP7, IP8, AP10, IP10, FP10, FP13 (figura 6 e tabela 14), ocorreu amplificação de fragmentos que levantaram algumas dúvidas quanto à sua especificidade.

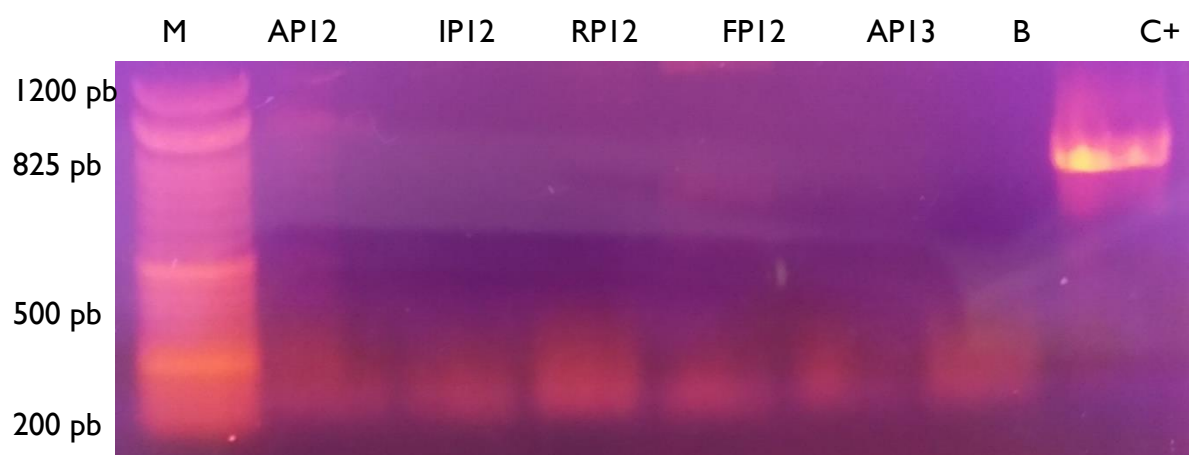


Figura 5 Separação eletroforética em gel de agarose 0,9% e coloração com brometo de etídio dos produtos do nested-PCR do gene *ssu rRNA* de *Cryptosporidium sp.*. (M: marcador de massa molecular NzyDNA Ladder VI (Nzytech); C+: controlo positivo; B: controlo negativo; API2, IPI2, RPI2, FPI2, API3: amostras)

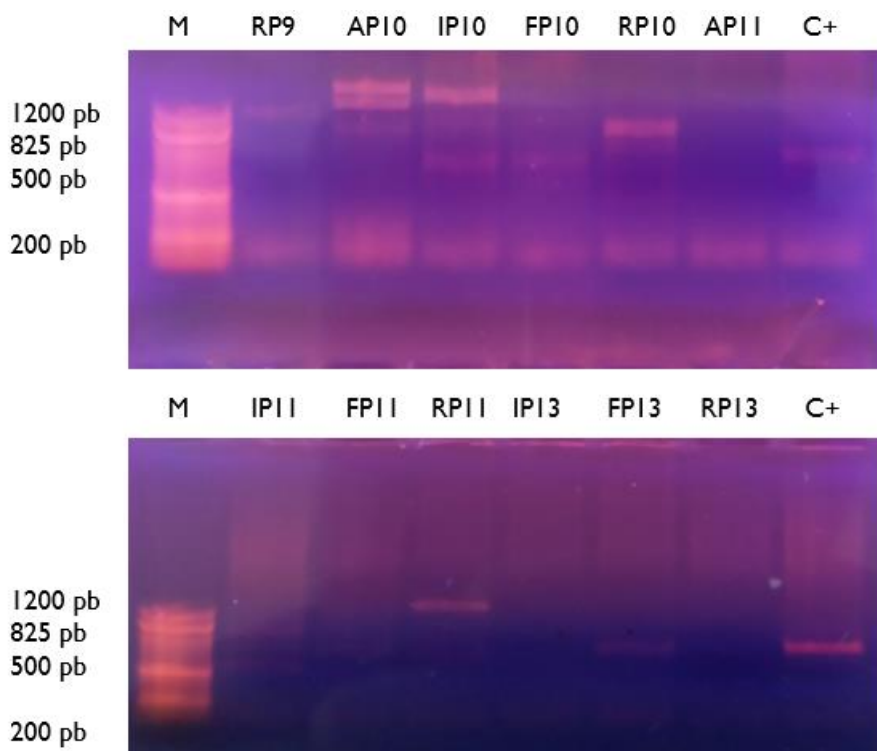


Figura 6 Separação eletroforética em gel de agarose 0,9% e coloração com brometo de etídio dos produtos do nested-PCR do gene *ssu rRNA* de *Cryptosporidium* sp.. (M: marcador de massa molecular NzyDNA Ladder VI (Nzytech); C+: controlo positivo; B: controlo negativo; RP9, AP10, IP10, FP10, RP10, AP11, IP11, FP11, RP11, IP13, FP13, RP13: amostras)

Tabela 14 Deteção de *Cryptosporidium* sp. por nested-PCR

Amostras	Nested-PCR
AP4, IP4, FP4, RP4, AP5, IP5, RP5, AP6, IP6, FP6, RP6, AP7, RP7, AP8, FP8, RP8, AP9, IP9, FP9, RP9, RP10, AP11, IP11, FP11, RP11, AP12, IP12, FP12, RP12, AP13, IP13, RP13	Negativo
FP5, IP7, FP7, IP8, AP10, IP10, FP10, FP13	Positivo (?)
Controlo negativo	-
Controlo positivo	+

4.3. Identificação de *Giardia* e *Cryptosporidium* por sequenciação

Foi realizada a purificação e sequenciação dos produtos resultantes da reação, sempre que se observou amplificação no nested-PCR específico de *Giardia* e de *Cryptosporidium*. As amostras controle de *Giardia* e de *Cryptosporidium* foram sequenciadas com sucesso e confirmaram a homologia com *Giardia* WBC6 e *Cryptosporidium parvum*. As amostras que apresentaram amplificação no nested-PCR do gene ssu RNA de *Cryptosporidium* (Tabela 14) foram sequenciadas. No entanto, as sequências não apresentaram homologia com *Cryptosporidium* mas foram identificadas algumas espécies de fungos, por exemplo *Fisculla terrestris*, *Mortierella* e *Scotullospera*, com 90-92% de homologia (Anexo 1). As amplificações foram, assim, consideradas inespecíficas.

Capítulo 5

Discussão

5. Discussão

As saladas são muito importantes numa alimentação saudável. Caraterizam-se por serem fonte de importantes vitaminas, minerais e fitonutrientes. O consumo diário regular está associado com a prevenção de algumas doenças, como doenças cardiovasculares e alguns cancros, e, portanto, é expectável que a produção e consumo destes alimentos continue a aumentar.

Em contraste com estes benefícios, durante as últimas décadas, têm surgido por todo o mundo surtos de gastroenterites causadas por patógenos de origem alimentar associados ao consumo de vegetais e saladas prontas a consumir (Mercanoglu Taban e Halkman, 2011).

Os parasitas *Giardia* e *Cryptosporidium* são causadores de doenças gastrointestinais em humanos e animais (Bouزيد et al., 2013; Feng e Xiao, 2011; Putignani e Menichella, 2010) e têm sido detetados em vegetais (Dixon et al., 2013; Said Said, El, 2012). Contudo, em Portugal são escassos os estudos de deteção destes parasitas em vegetais (Almeida, 2019; Ferreira, 2016; Marques et al., 2022; Pereira, 2016; Pina, 2017; Silva, 2021)

Assim, o objetivo do presente trabalho foi pesquisar a presença de *Giardia* e *Cryptosporidium* em saladas embaladas e prontas a consumir. Para tal, foram adquiridas 40 saladas em supermercados e foram aplicadas técnicas de biologia molecular, como nested-PCR e sequenciação com o objetivo de detetar ADN dos parasitas *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.* e de identificar as espécies e genótipos dos parasitas em estudo.

Neste estudo não foi detetada a presença nem de *Giardia* nem de *Cryptosporidium* nas amostras analisadas, sendo todas classificadas como negativas para os parasitas em estudo. Um estudo realizado em 2017, que pesquisou *Giardia* e *Cryptosporidium* em 80 amostras de vegetais, também obtiveram resultados negativos em todas as amostras (Pina, 2017). Em contraste, em 2016, foram analisadas 24 amostras de saladas embaladas e prontas a consumir, tendo sido detetado o genótipo A de *Giardia lamblia* em uma amostra, não se detetando *Cryptosporidium* (Pereira, 2016). Adicionalmente, o estudo realizado em 2019 com 36 amostras detetou o genótipo A de *G. lamblia*, em 11 amostras, não se detetando *Cryptosporidium sp.* (Almeida, 2019). Os fatores que determinam esta variabilidade são vários, como por exemplo os locais de origem das amostras. No estudo de 2017 as amostras foram obtidas em mercados municipais de Lisboa e Viseu, durante o mês de outubro de 2015 a fevereiro de 2016, e o tipo de vegetais escolhidos foram salsa, coentros, hortelã e agrião (Pina, 2017). No estudo de 2016, as amostras foram obtidas entre junho e setembro de 2015 na cidade de Coimbra, diretamente em hipermercados, e as saladas selecionadas foram as pré-embaladas, prontas a consumir de

três marcas diferentes e de vegetais variados (alface verde, roxa e frisada, rúcula, canónigos, agrião, radicchio) (Pereira, 2016). Já no estudo de 2019, as amostras foram adquiridas durante o mês de outubro de 2018, as saladas escolhidas foram pré-embaladas de quatro variedades (rúcula selvagem, agrião, alface frisada e salada ibérica) de três marcas diferentes (Almeida, 2019). Tendo em conta que os estudos foram realizados em momentos diferentes e com origens diferentes, seria expectável que ocorressem diferenças nos resultados.

A altura do ano, o mês de recolha, e as condições climatéricas podem influenciar. Mudanças de temperatura, precipitação, humidade e vento podem influenciar as culturas e os microrganismos que estão associados aos ambientes de produção. As mudanças climáticas podem potencialmente aumentar a capacidade dos patógenos de sobreviver e persistir no solo, na água e nas culturas, aumentando os riscos para a saúde humana. (Jung, Jang e Matthews, 2014)

Os vegetais são cultivados e colhidos sob diversas condições climáticas e geográficas. Quando se pensa na segurança microbiana dos vegetais, as condições ambientais influenciadas por mudanças climáticas ou região geográfica devem ser consideradas, pois tais mudanças podem influenciar características genéticas, fenotípicas e fisiológicas de microrganismos que normalmente contaminam vegetais no campo. (Jung, Jang e Matthews, 2014)

O aumento da intensidade de precipitação pode aumentar a sobrevivência de patógenos no solo e nas fezes usadas para fertilização, aumentando o teor de humidade (Warriner *et al.*, 2009). A maior intensidade de chuva também pode levar à contaminação de vegetais com patógenos por respingos de fezes e partículas do solo e pela disseminação de patógenos em todo o campo quando ocorrem eventos de inundações. (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2012)

Estas inundações e cheias, também podem contribuir para o arrastamento de poluentes para o meio hídrico, contaminando as linhas de água e ao mesmo tempo aumentando o risco de contaminação cruzada entre redes de esgoto e a rede de distribuição de água potável, ficando a água exposta à contaminação de microrganismos. Esta situação pode levar a um aumento da incidência de doenças com origem hídrica e alimentar, destacando-se *Giardia* e *Cryptosporidium*. Períodos de pluviosidade intensa estão associados a uma maior probabilidade de detetar quistos de *Giardia* e ooquistos de *Cryptosporidium*. A temperatura e a humidade relativa também são responsáveis por influenciar a viabilidade dos protozoários patogénicos (Pina, 2017).

No entanto, nos estudos realizados em saladas embaladas e prontas a consumir não se sabe em que condições as saladas foram produzidas. Mundialmente, têm sido realizados vários estudos com o objetivo de identificar estes parasitas em saladas prontas a consumir. Um estudo realizado em 544 saladas adquiridas num mercado em Ontário, no Canadá, detetou

Cryptosporidium sp. em 32 amostras (5,9%) e *Giardia* em 10 amostras (1,8%). Através da sequenciação, a espécie *Cryptosporidium parvum* foi identificada em 29 amostras e a espécie *Giardia lamblia* foi identificada em 9 amostras, (7 genótipo B e 2 genótipo A) (Dixon et al., 2013). Todas as espécies de *Cryptosporidium* como os genótipos de *Giardia* identificadas são consideradas zoonóticas.

Em Alexandria, Egito, um estudo detetou parasitas intestinais em 31,7% das amostras de vegetais crus, incluindo quistos de *Giardia* e ooquistos de *Cryptosporidium*. A rúcula foi o vegetal mais contaminado e *Cryptosporidium* foi o parasita mais detetado. (Said Said, El, 2012) O facto de não ter ocorrido amplificação em nenhuma das amostras analisadas no presente estudo, não significa obrigatoriamente que as saladas não estivessem contaminadas. Os quistos e ooquistos dos parasitas podem estar presentes em quantidades inferiores ao limite de deteção do método utilizado. Outro fator que pode condicionar a deteção é a taxa de recuperação durante o processamento das saladas. O método limita a quantidade de amostra a usar, sendo que parte dos quistos e ooquistos perdem-se durante esta fase. As taxas de recuperação dos quistos e ooquistos das saladas nunca é de 100%, dependendo da solução utilizada no processamento e do tipo de vegetal (Almeida, 2019; Carvalho, 2009; Shields, Lee e Murphy, 2012). A eficácia da rutura dos quistos e ooquistos durante a extração do ADN também podem condicionar a eficácia da deteção. De modo a minimizar este aspeto, a extração do ADN foi realizada com esferas de vidro.

As saladas podem ser contaminadas com estádios infecciosos dos parasitas em diversos pontos, desde o campo de produção, embalagem e transporte até chegar ao consumidor. De forma geral, a contaminação é mais provável em países em desenvolvimento, onde as infeções são endémicas e onde a qualidade da água e os níveis de higiene e saneamento são baixos, dessa forma saladas e vegetais vindos desses países são de maior preocupação. (Dixon, 2016)

Durante a fase do campo pode ocorrer a contaminação direta dos produtos, antes da colheita, quando existe a aplicação de fezes como fertilizantes e devido ao acesso direto de animais aos campos cultivados. A contaminação indireta dos produtos agrícolas ocorre através da utilização de água contaminada com fezes para irrigação, da mistura de pesticidas e na lavagem de produtos através dos equipamentos e das mãos dos manipuladores. A contaminação indireta, através da utilização de água contaminada para fins de irrigação é particularmente preocupante em regiões onde os sistemas de tratamento de água e saneamento são precários. De facto, os quistos de *Giardia* e ooquistos de *Cryptosporidium* são resistentes à desinfeção química por cloro, que é o desinfetante mais utilizado na indústria das saladas. Outro fator que facilita a transmissão alimentar de *Giardia* e *Cryptosporidium* é a sua baixa dose infecciosa e a capacidade dos ooquistos e quistos sobreviverem a temperaturas de

refrigeração, utilizadas no transporte e armazenamento dos produtos frescos (Barlaam *et al.*, 2022; Dixon, 2016).

A contaminação também pode ocorrer ao nível do manipulador e até mesmo do consumidor dos alimentos. A contaminação direta de produtos frescos por manipuladores de alimentos que estão infetados ou que estiveram em contato próximo com indivíduos infetados está associada à má higiene pessoal e é provavelmente um dos principais fatores de contaminação dos alimentos (Dixon, 2016). Quando os alimentos são contaminados a este nível, existem muito poucas formas disponíveis para inativar, destruir ou remover os parasitas dos produtos frescos. Embora, seja sempre recomendável a lavagem dos vegetais com água, para a redução do risco de transmissão de doenças, é difícil que esta prática remova todos os quistos e ooquistos dos parasitas uma vez que os vegetais possuem fendas e estruturas na superfície que podem reter as estruturas parasitárias (Dixon, 2015).

Tendo em conta que os produtos frescos são normalmente consumidos crus, sem nenhum tipo de processamento, é necessário que exista a implementação de medidas de controlo para minimizar o risco de contaminação, como a remoção ou inativação dos parasitas de modo a reduzir o risco de doença nos consumidores (Dixon, 2016).

Existem várias medidas de controlo que podem ser implementadas. Na fase de pré-colheita, os produtos devem ser irrigados com água devidamente tratada, sem contaminações, deve existir o monitoramento da saúde e higiene dos trabalhadores, melhoria do saneamento nos locais de cultivo e acesso restrito do gado e outros animais às culturas e às águas superficiais. A água usada para irrigação, lavagem dos produtos frescos e lavagem de mãos e equipamentos, deve ser filtrada adequadamente, devido ao facto de que a cloração tem pouco efeito sobre a viabilidade destes parasitas. Devem existir também boas práticas de higiene por parte dos trabalhadores envolvidos no cultivo, colheita, processamento e embalagem dos produtos, sendo mais uma medida essencial para reduzir a probabilidade de contaminação. É importante também, garantir que trabalhadores doentes sejam impedidos de todas as atividades que envolvam manipulação de alimentos e que existam infraestruturas como casas de banho e lavatórios para os trabalhadores agrícolas (Budu-Amoako *et al.*, 2011; Dixon, 2016; Koutsoumanis *et al.*, 2018).

Na pós-colheita, as medidas de controlo incluem principalmente o uso de água tratada para a lavagem e processamento dos produtos e para a limpeza das mãos e equipamentos, e também a monitorização e aplicação de práticas de boa higiene pessoal por parte dos manipuladores de alimentos (Dixon, 2016).

O uso de desinfetantes químicos e físicos nos alimentos, superfícies e equipamentos de trabalho, também deve ser considerado como uma potencial barreira à transmissão alimentar

de parasitas protozoários (Dixon, 2016). A maioria dos parasitas protozoários são classificados como muito resistentes aos desinfetantes químicos mais usados na indústria alimentícia (Dixon *et al.*, 2014), no entanto alguns gases desinfetantes têm se mostrado eficazes (Ortega *et al.*, 2008). A pasteurização, irradiação e o processamento de alta pressão, que são classificados como métodos de desinfecção física, têm demonstrado eficácia contra os parasitas em produtos frescos (Deng e Cliver, 2001; Dubey *et al.*, 1998; Kniel *et al.*, 2007; Lindsay *et al.*, 2008; Slifko, Raghubeer e Rose, 2000).

A prevenção e controlo da transmissão de quistos e ooquistos viáveis de vegetais contaminados é muito importante para a saúde pública, a fim de evitar a transmissão de doenças, e pode ser alcançada através do HACCP, adaptado especificamente para a eliminação de estruturas parasitárias viáveis em cada sistema de produção hortícola individual. No entanto, depender de medidas de controlo, como a eliminação das estruturas parasitárias, requer dados de sobrevivência obtidos cientificamente do processo de controlo que está a ser examinado. Os produtores hortícolas devem dar especial atenção ao desenvolvimento de estratégias de HACCP eficientes no controlo das estruturas parasitárias, dependendo do tipo de vegetal e do parasita. A adaptação de planos HACCP já estabelecidos para outro patógenos deve ser desencorajada, visto que a sobrevivência dos patógenos difere significativamente (Moore *et al.*, 2007).

Em conclusão, e tendo em conta que neste estudo foram analisadas saladas pré-embaladas, era expectável que as saladas estivessem prontas para serem consumidas sem qualquer pré-tratamento. De facto, neste estudo não se detetaram os protozoários parasitas *G. lamblia* e *Cryptosporidium* e, portanto, as saladas estariam em boas condições para serem consumidas. No entanto, outros estudos já realizados mostraram que podem ocorrer contaminações por estes parasitas intestinais. Portanto, é necessário continuar a pesquisar estes parasitas nas saladas, desenvolver métodos eficazes na sua inativação e que sejam implementados planos como o HACCP, que visam a segurança alimentar.

Referências bibliográficas

AGUIAR, Ricardo S. *et al.* - Physical hazards in dairy products: Incidence in a consumer complaint website in Brazil. *Food Control*, 86, (2018) 66–70. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.11.020.

ALMEIDA, Daniela. Detecção dos protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.* em saladas embaladas. Universidade de Coimbra, (2019). Dissertação de Mestrado.

AMAHMID, O; ASMAMA, S; BOUHOUM, K. - The effect of waste water reuse in irrigation on the contamination level of food crops by *Giardia* cysts and *Ascaris* eggs. *International Journal of Food Microbiology*. 49:1–2 (1999) 19–26. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00058-6.

APPELBEE, A. J. *et al.* - Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Veterinary Parasitology*. 112:4 (2003) 289–294. doi: 10.1016/S0304-4017(02)00422-3.

ARAUJO, Ronalda - 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). Universidade de São Paulo, 2015. Tese de Doutorado.

ARISSETO-BRAGOTTO, Adriana Pavesi; FELTES, Maria Manuela Camino; BLOCK, Jane Mara - Food quality and safety progress in the Brazilian food and beverage industry: Chemical hazards. *Food Quality and Safety*. 1:2 (2017) 117–129. doi: 10.1093/fqsafe/fyx009.

ASAE - O que é HACCP. 2007. [Consult. 11 mai. 2022]. Disponível em <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/haccp.aspx>

ASAE - Perigos de Origem Alimentar. 2018. [Consult. 31 mai. 2022]. Disponível em <https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx>

BAPTISTA, Paulo; VENÂNCIO, Armando - Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. Forvisão, (2003).

BARLAAM, A. *et al.* - Ready-to-eat salads and berry fruits purchased in Italy contaminated by *Cryptosporidium spp.*, *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica*. *International Journal of Food Microbiology*. 370, (2022) 1-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109634.

BATT, Carl . - Chemical and Physical Hazards in Food. Reference Module in Food Science. (2016) 1-2 doi: 10.1016/b978-0-08-100596-5.03437-5

BEUCHAT, Larry R. - Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*. 4:4 (2002) 413–423. doi: 10.1016/S1286-4579(02)01555-1.

BOUZID, Maha *et al.* - *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*. 26:1 (2013) 115–134. doi: 10.1128/CMR.00076-12.

BOUZID, Maha; STEVERDING, Dietmar; TYLER, Kevin M. - Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. *Current Opinion in Biotechnology*. 19:3 (2008) 302–306. doi: 10.1016/j.copbio.2008.05.002.

BUDU-AMOAKO, Ebo *et al.* - Foodborne illness associated with *Cryptosporidium* and *Giardia* from livestock. *Journal of Food Protection*. 74:11 (2011) 1944–1955. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-107.

CAMARGO, Maristela; CARVALHO DE SOUZA, Karoline; MARQUEZ, Daniela De Stefani - As Consequencias De Uma Contaminação Cruzada Em Unidades De Alimentação E Nutrição. Faculdade Atenas. (2017) 1–8.

CARVALHO, Therezinha Travassos Ribeiro De - Estado actual do conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. *Revista de Patologia Tropical*. 38:1 (2009) 1–16.

CDC - Parasites - *Cryptosporidium* (also known as «Crypto») 2021. [Consult. 13 jun. 2022]. Disponível em <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/pathogen.html>

CEVALLOS-CEVALLOS, JUAN M. *et al.* - Dispersal of *Salmonella Typhimurium* by Rain Splash onto Tomato Plants. *Journal of Food Protection*. 75:3 (2012) 472–479. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-399.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION - Recommended International code of practice general principles of food hygiene CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003. *Cac/Rcp 1-1969*. 2003) 1–31.

DAWSON, David - Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology*. 103:2 (2005) 207–227. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.032.

DENG, MING QI; CLIVER, DEAN O. - Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Cider by Flash Pasteurization. *Journal of Food Protection*. 64:4 (2001) 523–527. doi: 10.4315/0362-028X-64.4.523.

DIXON, B. R. et al. - Protozoan Parasites: *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*, and *Toxoplasma*. Em Rapid Detection, Characterization, and Enumeration of Foodborne Pathogens. Washington, DC, USA : ASM Press, (2014) p. 349–370. Disponível em <http://doi.wiley.com/10.1128/9781555817121.ch24>

DIXON, Brent et al. - Detection of *cyclospora*, *cryptosporidium*, and *giardia* in ready-to-eat packaged leafy greens in Ontario, Canada. *Journal of Food Protection*. 76:2 (2013) 307–313. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-282.

DIXON, B. R. - Transmission dynamics of foodborne parasites on fresh produce. *Foodborne Parasites in the Food Supply Web*. 2015. [Consult. 11 mai. 2022] Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781782423324000138>>. p. 317–353.

DIXON, Brent R. - Parasitic illnesses associated with the consumption of fresh produce - an emerging issue in developed countries. *Current Opinion in Food Science*. 8 (2016) 104–109. doi: 10.1016/j.cofs.2016.04.009.

DUBEY, J. P. et al. - Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. *International Journal for Parasitology*. (1998) 369–375. doi: 10.1016/S0020-7519(97)83432-7.

EFSA - A ciência em prol da proteção dos consumidores - Desde o campo até à mesa. (2012). 1-12.

EFSA - Plano estratégico da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos. (2013). 1-52.

FALLAH, Aziz A; MAKHTUMI, Yurtai; PIRALI-KHEIRABADI, Khodadad - Seasonal study of parasitic contamination in fresh salad vegetables marketed in Shahrekord, Iran. *Food Control*. 60:1 (2016) 538–542. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.08.042.

FAUBERT, Gaétan - Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 13:1 (2000) 35–54. doi: 10.1128/CMR.13.1.35-54.2000.

FAYER, Ronald - Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*. 124:1 (2010) 90–97. doi: 10.1016/j.exppara.2009.03.005.

FENG, Yaoyu; XIAO, Lihua - Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 24:1 (2011) 110–140. doi: 10.1128/CMR.00033-10.

FERREIRA, SG - Higiene e segurança alimentar em vegetais para consumo humano:

comparação entre produtos de agricultura biológica e convencional. Universidade de Lisboa, 2016. Dissertação de Mestrado.

HOPKINS, Richard 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*. 83:1 (1997) 44–51. doi: 10.2307/3284315.

JUNG, Yangjin; JANG, Hyein; MATTHEWS, Karl R. - Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. *Microbial Biotechnology*. 7:6 (2014) 517–527. doi: 10.1111/1751-7915.12178.

KENNER, Larry - Chemical and Physical Hazards: the “Other” Food Safety Risks. *Food Testing & Analysis*. (2001) 1-3.

KNIEL, Kalmia E. *et al.* - High Hydrostatic Pressure and UV Light Treatment of Produce Contaminated with *Eimeria acervulina* as a *Cyclospora cayetanensis* Surrogate. *Journal of Food Protection*. 70:12 (2007) 2837–2842. doi: 10.4315/0362-028X-70.12.2837.

KOUTSOUMANIS, Kostas *et al.* - Public health risks associated with food-borne parasites. *EFSA Journal*. 16:12 (2018). doi: 10.2903/j.efsa.2018.5495.

KOZAN, Esmá *et al.* - Prevalence of helminth eggs on raw vegetables used for salads. *Food Control*. 16:3 (2005) 239–242. doi: 10.1016/j.foodcont.2004.02.005.

LASEK-NESELQUIST, Erica; WELCH, David Mark; SOGIN, Mitchell 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*. 40:9 (2010) 1063–1074. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.02.015.

LINDSAY, David S. *et al.* - Effects of High Pressure Processing on *Toxoplasma gondii* Oocysts on Raspberries. *Journal of Parasitology*. 94:3 (2008) 757–758. doi: 10.1645/GE-1471.1.

LYU, Zhangxia *et al.* - A new species of *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcocystidae: Hexamitidae) in hamsters. *Parasites and Vectors*. 11:1 (2018) 1–8. doi: 10.1186/s13071-018-2786-8.

MARQUES, Cláudia S. *et al.* - Protozoa as the “Underdogs” for Microbiological Quality Evaluation of Fresh Vegetables. *Applied Sciences*. 12:14 (2022) 7145. doi: 10.3390/app12147145.

MEDEIROS, Raphael Corrêa - Comparação da resistência de protozoários patogênicos

- *Giardia spp.* e *Cryptosporidium spp.* – e de microrganismos indicadores à desinfecção sequencial Cloro-Radiação Ultravioleta e Ozônio-Radiação Ultravioleta. Universidade de São Paulo, 2010. Dissertação de Mestrado.

MERCANOGLU TABAN, Birce; HALKMAN, A. Kadir - Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*. 17:6 (2011) 286–287. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.04.004.

MONIS, Paul T.; THOMPSON, R. C. A. - *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: Fact or fiction? *Infection, Genetics and Evolution*. 3:4 (2003) 233–244. doi: 10.1016/j.meegid.2003.08.003.

MOORE, John E. et al. - Detection of *cryptosporidium parvum* in lettuce. *International Journal of Food Science and Technology*. 42:4 (2007) 385–393. doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.01235.x.

NEVES, David Pereira et al. - *Parasitologia Humana*. 11ª edição. Atheneu. (2005).

NJUNINA, Violetta - Food safety definition & why is food safety important. 2021. [Consult. 11 jul. 2022]. Disponível em <https://www.fooddocs.com/post/why-is-food-safety-important>

ORTEGA, Ynes R. et al. - Efficacy of Gaseous Chlorine Dioxide as a Sanitizer against *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, and *Encephalitozoon intestinalis* on Produce. *Journal of Food Protection*. 71:12 (2008) 2410–2414. doi: 10.4315/0362-028X-71.12.2410.

PEREIRA, Adelaide - Deteção dos protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.* em saladas pré-embaladas. Universidade de Coimbra, 2016. Dissertação de Mestrado.

PINA, Inês - Deteção de *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Escherichia coli* em vegetais consumidos crus e possíveis implicações em saúde pública. Universidade de Lisboa, 2017. Dissertação de Mestrado.

PLUTZER, Judit; ONGERTH, Jerry; KARANIS, Panagiotis - *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 213:5 (2010) 321–333. doi: 10.1016/j.ijheh.2010.06.005.

PUTIGNANI, Lorenza; MENICHELLA, Donato - Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2010 (2010) 1–39. doi: 10.1155/2010/753512.

Regulamento (Ce) N.852/2004 - 22 (2011) 1–76.

REY, Luís - Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008 ISBN 9788527714068.

SAID SAID, Doaa EL - Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. Alexandria Journal of Medicine. 48:4 (2012) 345–352. doi: 10.1016/j.ajme.2012.05.005.

SHIELDS, Joan M.; LEE, Michelle Minjung; MURPHY, Helen R. - Use of a common laboratory glassware detergent improves recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from lettuce, herbs and raspberries. International Journal of Food Microbiology. . 153:1–2 (2012) 123–128. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.025.

SHUVAL, Hillel I; YEKUTIEL, Perez; FATTAL, Badri - Epidemiological Evidence for Helminth and Cholera Transmission by Vegetables Irrigated with Wastewater: Jerusalem – A Case Study. Water Science and Technology. 17:4–5 (1985) 433–442. doi: 10.2166/wst.1985.0149.

SILVA, Maria Madalena Pires De Mendonça - Detecção de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium spp.* em água e vegetais frescos. Universidade de Aveiro, 2021. Dissertação de Mestrado.

ŠLAPETA, Jan - Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? International Journal for Parasitology. 43:12–13 (2013) 957–970. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.07.005.

SLIFKO, Theresa R.; RAGHUBEER, Errol; ROSE, Joan B. - Effect of High Hydrostatic Pressure on *Cryptosporidium parvum* Infectivity. Journal of Food Protection. 63:9 (2000) 1262–1267. doi: 10.4315/0362-028X-63.9.1262.

SPRONG, Hein; CACCIÒ, Simone M.; GIESSEN, Joke W. B. VAN DER - Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. PLoS Neglected Tropical Diseases. 3:12 (2009) 1–12. doi: 10.1371/journal.pntd.0000558.

THOMPSON, R. C. A.; HOPKINS, R. M.; HOMAN, W. L. - Nomenclature and genetic groupings of *giardia* infecting mammals. Parasitology Today. 16:5 (2000) 210–213. doi: 10.1016/S0169-4758(99)01624-5.

THOMPSON, R. C. Andre. - The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. Veterinary Parasitology. 126:1-2 (2004) 15–35. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.09.008.

WARRINER, Keith *et al.* - Chapter 4 Recent Advances in the Microbial Safety of Fresh Fruits and Vegetables. Academic Press. 57. 2009. 155-208. doi: 10.1016/S1043-4526(09)57004-

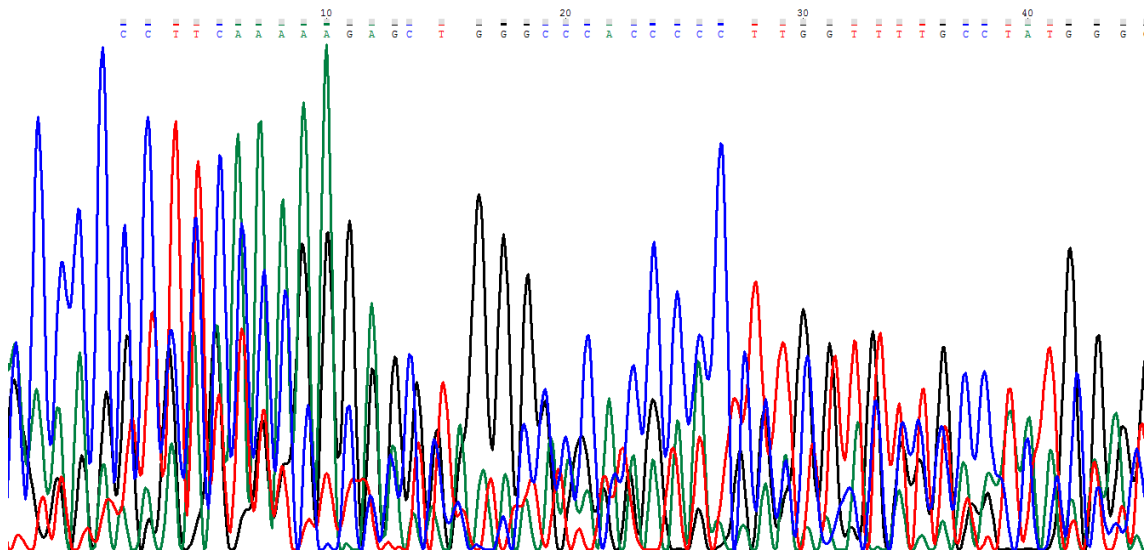
WEINROTH, Margaret D.; BELK, Aerial D.; BELK, Keith E. - History, development, and current status of food safety systems worldwide. *Animal Frontiers*. 8:4 (2018) 9–15. doi: 10.1093/af/vfy016.

XIAO, Lihua *et al.* - Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small- subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:4 (1999) 1578–1583. doi: 10.1128/aem.65.4.1578-1583.1999.

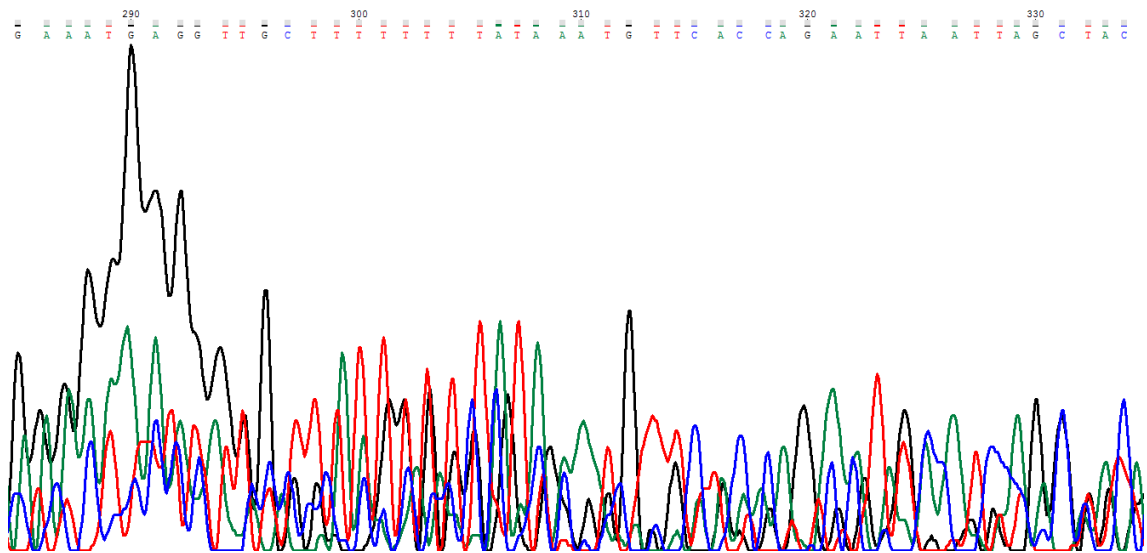
Anexos

Anexo I

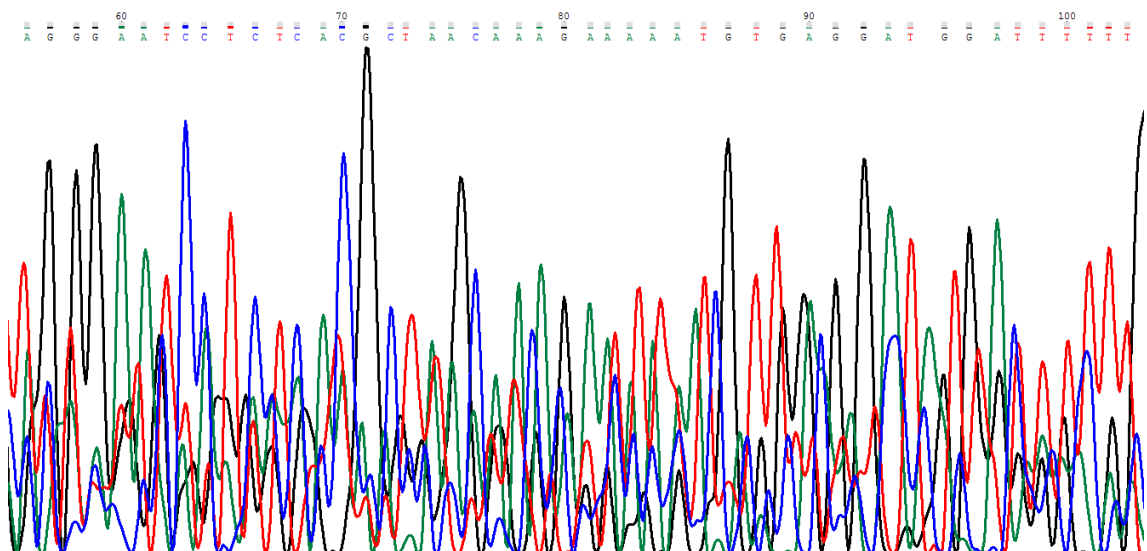
Sequência BPF986-*Cryptosporidium* FP5



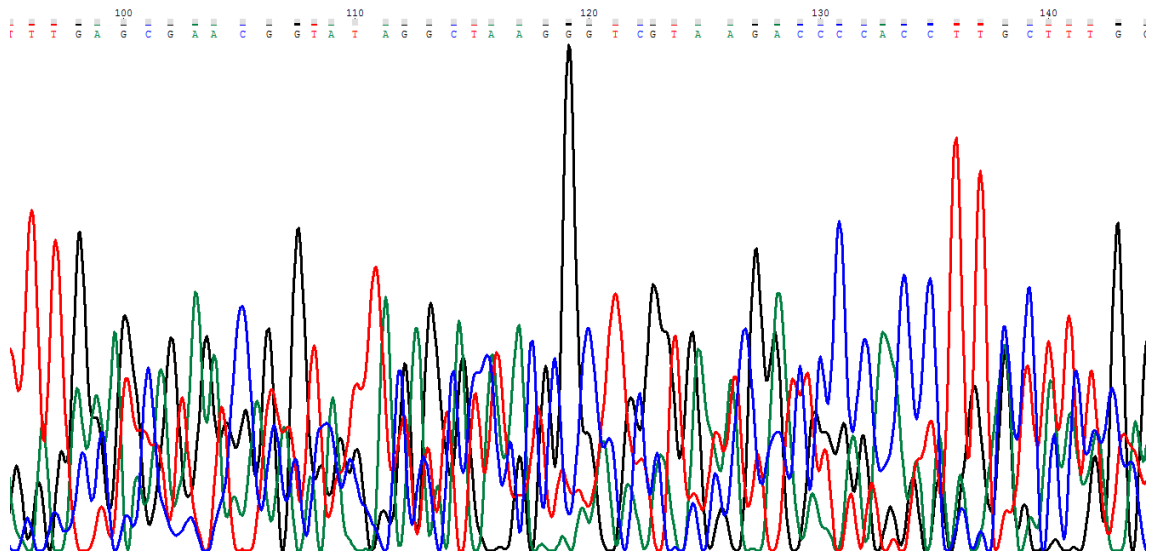
Sequência BPF987-*Cryptosporidium* API0



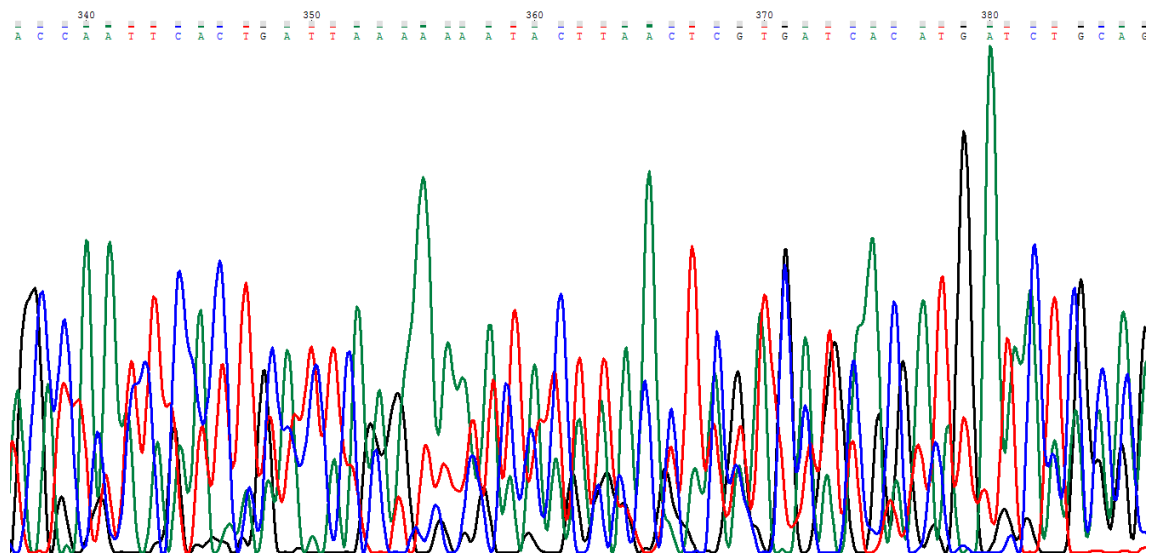
Sequência BPF988-*Cryptosporidium* FP7



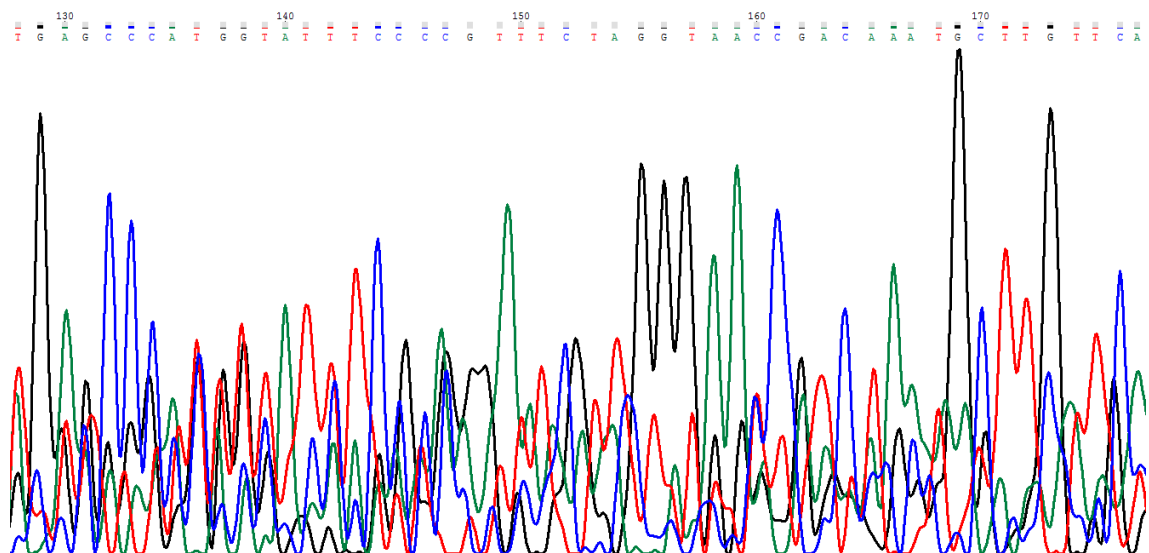
Sequência BPF989-*Cryptosporidium* IP8



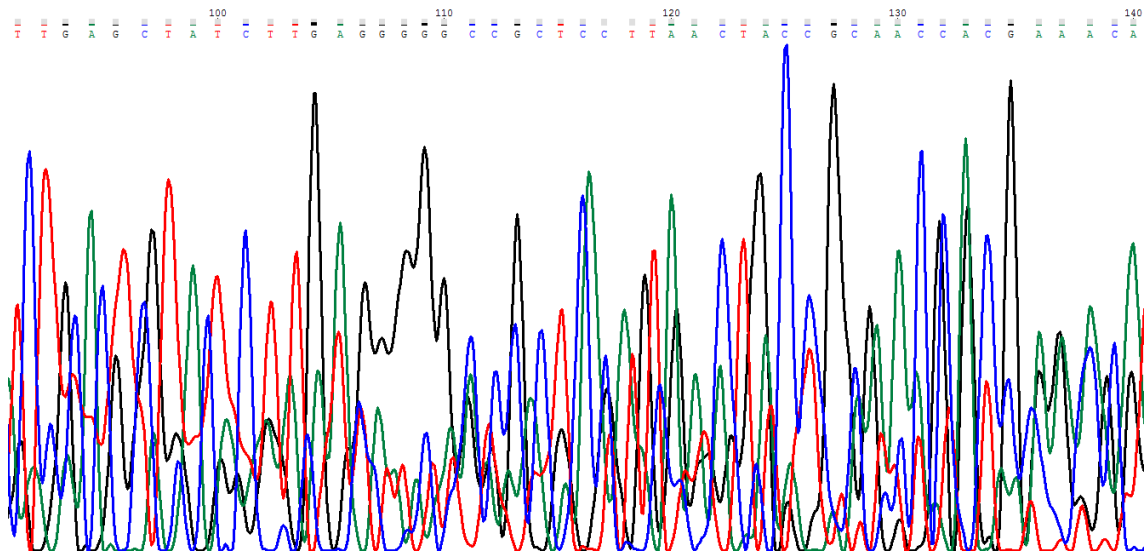
Sequência BPF990-*Cryptosporidium* IP7



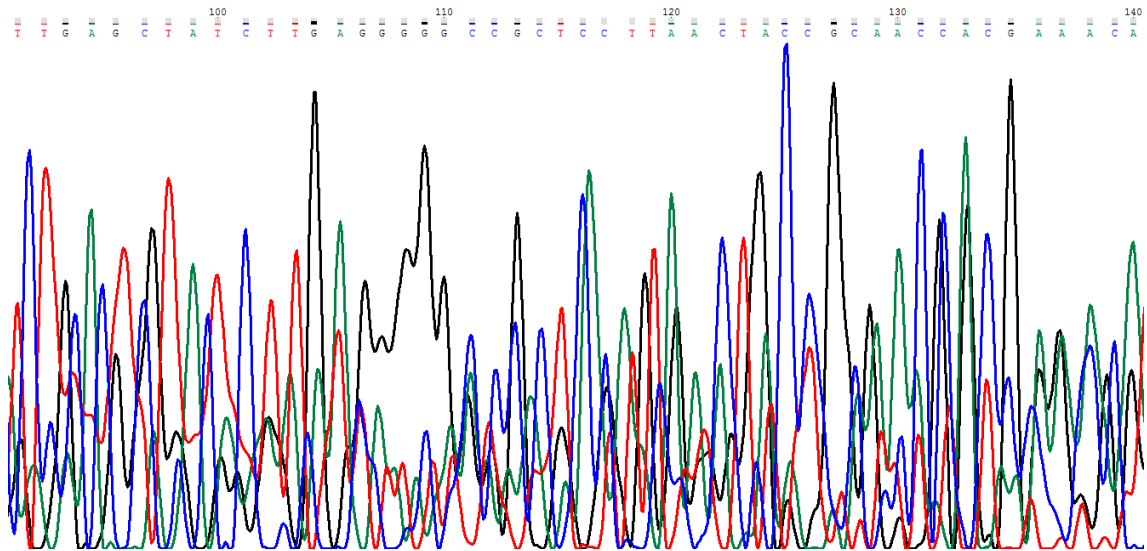
Sequência BPF991-*Cryptosporidium* IP10



Sequência BPF992-*Cryptosporidium* FP10



Sequência BPF993-*Cryptosporidium* FP13



Anexo II

Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show	100
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected										GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession					
<input checked="" type="checkbox"/> Capillidium rhyosporum ARSEF 448 18S rRNA gene, partial sequence, from TYPE material	Capillidium rhyo...	497	497	96%	2e-137	79.84%	1787	NG_065501.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Conidiobolus pumilus strain ARSEF 453 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Capillidium pumil...	486	486	96%	4e-134	79.61%	1773	JX242615.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Conidiobolus pumilus small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Capillidium pumil...	486	486	96%	4e-134	79.61%	1780	AF368511.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Fisculla terrestris 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Fisculla terrestris	479	479	47%	7e-132	91.43%	1728	KP728379.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Salpingoeca macrocollata strain ATCC 50938 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Salpingoeca mac...	477	757	85%	2e-131	91.40%	1745	KT757482.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Phytoecomonas venanatanis 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Phytoecomona ...	470	470	47%	4e-129	90.88%	9955	MF034900.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Rhogostoma cylindrica isolate KD1020 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Rhogostoma cyli...	470	470	47%	4e-129	90.88%	1635	KY905096.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Rhogostoma epiphylla isolate KD1019 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Rhogostoma epi...	470	470	47%	4e-129	90.88%	1653	KY905095.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Pigoraptor chiliana strain Opistho-2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Pigoraptor chiliana	468	718	85%	1e-128	91.04%	1792	MF190553.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Syssoomonas multiformis strain Colp-12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Syssoomonas mul...	468	698	85%	1e-128	91.07%	1751	MF190551.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Gromochytrium mamkaevae strain CALU x-51 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Gromochytrium ...	468	694	84%	1e-128	91.50%	6233	KF586842.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Piptocephalis corymbifera strain NRRL 2385 18S rRNA gene, partial sequence, from reference material	Piptocephalis cor...	468	657	70%	1e-128	91.09%	1736	NG_017192.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Endogone botryocarpus E-14001 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	Endogone botryo...	462	726	85%	7e-127	90.78%	1696	LC431079.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Pigoraptor vietnamica strain Opistho-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Pigoraptor vietna...	462	716	85%	7e-127	90.75%	1794	MF190552.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizaspis rugosa 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Rhizaspis rugosa	462	462	47%	7e-127	90.57%	1693	KX580627.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Basidiobolus magnus strain CBS 205.64 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Basidiobolus ma ...	462	731	85%	7e-127	90.78%	1664	JX242608.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Basidiobolus heterosporus CBS 311.66 18S rRNA gene, partial sequence, from TYPE material	Basidiobolus het...	462	731	85%	7e-127	90.78%	1719	NG_070282.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Allomyces arbusculus UCBMG Brazil 2 18S rRNA gene, partial sequence, from reference material	Allomyces arbus...	462	685	85%	7e-127	90.78%	1860	NG_017166.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Raccocetra crisper isolate CMPC739.2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Raccocetra crisper	460	692	85%	2e-126	90.54%	3087	KX529097.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Mortierella elongatula strain CBS 488.70 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Mortierella elong...	460	729	85%	2e-126	90.72%	995	HQ667505.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Gryganskiella cystojenkini CBS 456.71 18S rRNA gene, partial sequence, from TYPE material	Gryganskiella cy...	460	729	85%	2e-126	90.72%	995	NG_070273.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Podilla humilis CBS 222.35 18S rRNA gene, partial sequence, from TYPE material	Podilla humilis	460	729	85%	2e-126	90.72%	996	NG_070265.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Podilla epicladia CBS 355.76 18S rRNA gene, partial sequence, from TYPE material	Podilla epicladia	460	724	85%	2e-126	90.72%	997	NG_070262.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Podilla clonocystis CBS 357.76 18S rRNA gene, partial sequence, from TYPE material	Podilla clonocystis	460	724	85%	2e-126	90.72%	997	NG_070261.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Mortierella microzygospora strain CBS 880.97 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Mortierella micro...	460	729	85%	2e-126	90.72%	996	HQ667478.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Necromortierella dichotoma CBS 221.35 18S rRNA gene, partial sequence, from TYPE material	Necromortierella ...	460	729	85%	2e-126	90.72%	995	NG_070259.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Mortierella elongatula CBS 488.70 18S rRNA gene, partial sequence, from TYPE material	Mortierella elong...	460	729	85%	2e-126	90.72%	995	NG_070274.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Mortierella microzygospora CBS 880.97 18S rRNA gene, partial sequence, from TYPE material	Mortierella micro...	460	729	85%	2e-126	90.72%	996	NG_070260.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Gaertneriomyces spectabilis NTNU 067 18S rRNA gene, partial sequence, from TYPE material	Gaertneriomyces ...	460	718	85%	2e-126	90.75%	1058	NG_070238.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Mortierella fimbricystis strain CBS 943.70 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Gryganskiella fim...	460	460	47%	2e-126	90.72%	934	GU559980.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Gaertneriomyces spectabile voucher NTNU 067 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Gaertneriomyces ...	460	718	85%	2e-126	90.75%	1058	FJ827661.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Microallomyces dendroideus UCBMG CR74 18S rRNA gene, partial sequence, from TYPE material	Microallomyces ...	457	707	85%	3e-125	90.52%	1849	NG_061026.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Kuzuhaea moniliformis NRRL 13723 18S rRNA gene, partial sequence, from TYPE material	Kuzuhaea monilif...	457	457	47%	3e-125	90.52%	1740	NG_060972.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Scutellospora savannicola partial 18S rRNA gene, isolate Att1455-2, clone pCK075-3	Dentiscutata sav...	457	689	85%	3e-125	90.29%	1749	HE962475.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Dentiscutata savannicola partial 18S rRNA gene, isolate Att1455-2, clone pCK074-11	Dentiscutata sav...	457	689	85%	3e-125	90.29%	1757	HE962472.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Dentiscutata savannicola partial 18S rRNA gene, isolate Att1455-2, clone pCK074-6	Dentiscutata sav...	457	689	85%	3e-125	90.29%	1755	HE962467.1					
<input checked="" type="checkbox"/> Scutellospora savannicola partial 18S rRNA gene, isolate Att1455-2, clone pCK075-6	Dentiscutata sav...	457	689	85%	3e-125	90.29%	1757	HE962477.1					