



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Daniela Filipa Correia de Almeida

Deteção dos protozoários *Giardia lamblia* e  
*Cryptosporidium sp.* em saladas embaladas  
prontas a consumir

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

Julho de 2019





FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Daniela Filipa Correia de Almeida

Deteção dos protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.*  
em saladas embaladas prontas a consumir

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, julho de 2019



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

Após a realização desta etapa, gostaria de agradecer a todos os que contribuíram para que isto fosse possível.

Em primeiro lugar, à minha orientadora, Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa, por todo o apoio e disponibilidade demonstrados ao longo deste trabalho, bem como por todos os conhecimentos que me transmitiu, que foram imprescindíveis para a realização do mesmo.

À Doutora Clarissa Faria, por toda a ajuda, disponibilidade e conhecimentos transmitidos na parte do trabalho em que me acompanhou.

À Sandra, funcionária do laboratório de Microbiologia, não só pela preparação do material de laboratório, mas também pela constante boa disposição e prontidão para ajudar sempre que necessário.

À Andrea, colega de laboratório, que sempre se mostrou disponível para ajudar.

Às alunas de estágio Mara e Mariana, que me acompanharam em grande parte do trabalho, por toda a ajuda e incentivo prestados.

Aos meus pais e irmãos por todo o apoio, não só nesta etapa, mas também ao longo de todo o meu percurso académico. Foram fundamentais em todos os objetivos que já alcancei.

Por fim mas não menos importante, ao meu namorado Alexandre e sua família por todo o apoio e carinho que sempre tiveram para comigo.

Muito obrigada a todos!



# Índice

<b>Índice de tabelas</b> .....	<b>iii</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>v</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>ix</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xi</b>
<b>Capítulo I</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>3</b>
1.1. Segurança alimentar .....	3
1.2. Perigos de origem alimentar.....	4
1.3. Parasitoses de origem alimentar .....	7
1.3.1. <i>Giardia lamblia</i> .....	10
1.3.2. <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	14
1.4. Surtos alimentares associados a saladas embaladas prontas a consumir .....	19
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>25</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>27</b>
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>29</b>
<b>3. Material e métodos</b> .....	<b>31</b>
3.1. Caracterização e processamento das amostras .....	31
3.2. Extração de ADN total.....	32
3.3. Nested-PCR .....	33
3.3.1. <i>Giardia lamblia</i> .....	33
3.3.2. <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	34
3.4. PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	35
3.4.1. <i>Giardia lamblia</i> .....	35
3.4.2. <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	36
3.5. Visualização dos fragmentos de ADN amplificados no nested-PCR.....	38
3.6. Sequenciação .....	38
<b>Capítulo 4</b> .....	<b>39</b>
<b>4. Resultados</b> .....	<b>41</b>
4.1. Detecção de <i>Giardia lamblia</i> .....	41
4.1.1. Nested-PCR.....	41
4.1.2. PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	43

4.2. Detecção de <i>Cryptosporidium</i> sp. ....	46
4.2.1. Nested-PCR .....	46
4.2.2. PCR quantitativo em tempo real (qPCR) .....	46
4.3. Identificação de espécies/genótipos de <i>Giardia</i> por sequenciação .....	48
<b>Capítulo 5</b> .....	<b>51</b>
<b>5. Discussão</b> .....	<b>53</b>
<b>Referências bibliográficas</b> .....	<b>59</b>

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Perigos de origem alimentar e respectivos agentes.....	6
<b>Tabela 2.</b> Parasitas associados a doenças de origem alimentar.....	9
<b>Tabela 3.</b> Espécies de <i>Giardia</i> e respectivos hospedeiros.....	11
<b>Tabela 4.</b> Genótipos de <i>Giardia lamblia</i> e respectivos hospedeiros.....	11
<b>Tabela 5.</b> Exemplos de espécies de <i>Cryptosporidium</i> e principais hospedeiros .....	15
<b>Tabela 6.</b> Exemplos de surtos de infecções provocadas por microrganismos presentes em saladas e vegetais .....	21
<b>Tabela 7.</b> Identificação e caracterização das amostras de saladas .....	31
<b>Tabela 8.</b> Oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de nested-PCR para detecção de <i>Giardia lamblia</i> e <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	34
<b>Tabela 9.</b> Composição da mistura utilizada na reação de nested-PCR para detecção de <i>Giardia lamblia</i> .....	34
<b>Tabela 10.</b> Composição da mistura utilizada na reação de nested-PCR para detecção de <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	35
<b>Tabela 11.</b> Oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para detecção de <i>Giardia lamblia</i> e <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	37
<b>Tabela 12.</b> Composição da mistura utilizada na reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para detecção de <i>Giardia lamblia</i> e <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	37
<b>Tabela 13.</b> Detecção de <i>Giardia lamblia</i> por qPCR e nested-PCR .....	43
<b>Tabela 14.</b> Homologia das sequências do gene <i>ssu rRNA</i> de <i>Giardia</i> das amostras em estudo com as disponíveis no <i>GenBank</i> .....	48
<b>Tabela 15.</b> Diferenciação dos genótipos de <i>Giardia lamblia</i> com base nas posições nucleotídicas do gene <i>ssu rRNA</i> .....	50
<b>Tabela 16.</b> Genotipagem de <i>Giardia lamblia</i> com base nas posições nucleotídicas do gene <i>ssu rRNA</i> .....	50



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	18
<b>Figura 3.</b> Separação eletroforética em gel de agarose 2 % e coloração com brometo de etídio dos produtos do nested-PCR do gene <i>ssu rRNA</i> de <i>Giardia lamblia</i> .....	42
<b>Figura 4.</b> Curvas de amplificação (A) e de <i>melting</i> (B) do qPCR do gene <i>tpi</i> do genótipo A (WBC6) de <i>Giardia lamblia</i> .....	44
<b>Figura 5.</b> Curvas de amplificação (A) e de <i>melting</i> (B) do qPCR do gene <i>tpi</i> do genótipo B de <i>Giardia lamblia</i> .....	45
<b>Figura 6.</b> Separação eletroforética em gel de agarose 1 % e coloração com brometo de etídio dos produtos do nested-PCR do gene <i>ssu rRNA</i> de <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	46
<b>Figura 7.</b> Curva de amplificação (A) e de <i>melting</i> (B) do qPCR do gene <i>18S rDNA</i> de <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	47
<b>Figura 8.</b> Alinhamento múltiplo de fragmentos das sequências do gene <i>ssu rRNA</i> de <i>Giardia lamblia</i> da estirpe referência M54878 e da amostra FP2. ....	49



## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ASAE	Autoridade de segurança alimentar e económica
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina de soro bovino)
DGS	Direção geral de saúde
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
DVA	Doenças veiculadas por alimentos
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar)
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i> (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo)
HIV	<i>Human Immunodeficiency virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
Pb	Pares de base
PCC	Ponto crítico de controlo
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
ssu rRNA	Gene da subunidade menor do ARN ribossomal
TBE	Tris base, ácido bórico e EDTA
<i>Tpi</i>	Gene <i>triosephosphate isomerase</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)



## Resumo

Os protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.* são parasitas intestinais humanos que podem causar graves complicações no hospedeiro. A sua transmissão ocorre por via fecal-oral, podendo ser direta, através do contacto pessoa-pessoa ou pessoa-animal, ou indireta, através da ingestão de água ou alimentos contaminados. Entre estes alimentos encontram-se as saladas embaladas prontas a consumir, que são cada vez mais utilizadas pelos consumidores devido à sua natureza prática e rápida. No entanto, poderão estar contaminadas por fezes contendo quistos ou ooquistos destes protozoários, por exemplo devido à utilização de água de irrigação contaminada. Estas estruturas parasitárias são muito resistentes às condições ambientais bem como aos tratamentos de água, podendo permanecer infecciosos no ambiente durante longos períodos de tempo e, deste modo, contaminar os alimentos.

O objetivo do presente trabalho foi detetar e caracterizar estes protozoários em saladas embaladas prontas a consumir, de modo a avaliar o possível risco para os consumidores.

Foram analisadas 36 amostras de saladas de três marcas e de quatro variedades, adquiridas em supermercados das cidades de Coimbra e Viseu durante o mês de outubro de 2018. A extração de ADN foi realizada através do kit comercial *NZY Tissue gDNA Isolation Kit* (nzytech) e a deteção dos protozoários foi realizada por técnicas de nested-PCR e PCR quantitativo em tempo real (qPCR). A caracterização das espécies e génotipos foi realizada por sequenciação.

Observou-se amplificação do gene *ssu rRNA* de *Giardia lamblia* por nested-PCR em 17 das 36 amostras de saladas analisadas (47,22 %) e amplificação do gene *tpi* de *Giardia lamblia* por qPCR em 7 dessas amostras para os génotipos A ou B. As amostras positivas no nested PCR do gene *ssu rRNA* foram sujeitas a sequenciação e o génotipo A foi identificado em 11 delas (30,56 %). *Cryptosporidium sp.* não foi detetado em nenhuma das 36 amostras analisadas por nested-PCR e qPCR.

O facto de ter sido detetada *Giardia lamblia* génotipos A e B nas amostras de saladas analisadas é preocupante porque estes génotipos são responsáveis pela infeção no Homem e, ainda, porque é indicativo de que as saladas foram sujeitas a contaminação fecal.

Deste modo, é de extrema importância o estabelecimento de medidas que visem o controlo e prevenção da presença destes protozoários ao longo de todo o processamento das saladas, de modo a evitar que infetem os consumidores e possam ter graves consequências na sua saúde.

**Palavras-chave:** *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium sp.*, segurança alimentar, saladas embaladas prontas a consumir, parasitoses de origem alimentar, qPCR, nested-PCR, sequenciação.

## Abstract

The protozoa *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium sp.* are human intestinal parasites that can cause severe complications in their host. Its transmission occurs by the fecal-oral route, being able to be direct, through the contact person-person or person-animal, or indirect, through the ingestion of contaminated food or water. Packaged ready-to-eat salads are one of these foods, which are increasingly used by consumers because of their practical and fast nature. However may be contaminated if the waters used for irrigation are also contaminated by feces with cysts or oocysts of these protozoa. Those parasitic structures are very resistant to environmental conditions as well as to water treatments and can remain infectious in the environment for long periods of time and thus reach food.

This work intends to detect and characterize these two protozoa in packaged ready-to-eat salads, in order to evaluate the possible risk to the consumers.

Thirty-six samples of salads of three brands and four varieties, purchased at supermarkets in the cities of Coimbra and Viseu during the month of October, 2018, were analyzed. DNA extraction was performed using the NZY Tissue gDNA Isolation Kit (nzytech) and the detection of protozoa was performed by nested-PCR and real-time quantitative PCR (qPCR). The species / genotype characterization was performed by DNA sequencing.

Amplification of the *ssu rRNA Giardia lamblia* gene by nested-PCR was performed in 17 of the 36 samples analyzed (47.22 %) and amplification of the *Giardia lamblia tpi* gene by qPCR in 7 of those samples for genotype A or B. Positive samples in the nested-PCR of the *ssu rRNA* gene were sequenced and genotype A was identified in 11 (30.56 %). *Cryptosporidium sp.* was not detected in any of the 36 samples analyzed by nested-PCR and qPCR.

The fact that *Giardia lamblia* genotypes A and B has been detected in the samples analyzed is worrisome because those genotypes are responsible for the infection in humans and, also, because it is indicative that the salads were subjected to fecal contamination.

It is therefore extremely important to establish measures to control and prevent the presence of these protozoa throughout the processing of salads in order to prevent them from reaching consumers and may have serious consequences for their health.

**Keywords:** *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium sp.*, food safety, packaged ready-to-eat salads, food-borne parasitosis, qPCR, nested-PCR, sequencing.



# Capítulo I

## Introdução



# I. Introdução

## I.1. Segurança alimentar

A segurança alimentar é um direito de todas as pessoas e, cada vez mais, existe a preocupação em garanti-la, não só por parte das entidades reguladoras mas também por parte dos consumidores, que têm vindo a informar-se melhor sobre o que consomem, demonstrando uma maior preocupação para com os perigos a que poderão estar sujeitos através da sua alimentação.

Existem variadas doenças que podem ser transmitidas através da alimentação, podendo estas, na melhor das hipóteses, ser apenas desagradáveis, ou, em situações mais graves, podem ser fatais (WHO/FAO, 2003).

A responsabilidade de garantir a segurança dos alimentos pertence a todos os intervenientes na cadeia alimentar, incluindo os agricultores e produtores, os manipuladores e os consumidores, devendo cada um destes efetuar um controlo eficaz da higiene alimentar, evitando a deterioração dos alimentos e as consequências que isso possa ter na saúde (WHO/FAO, 2003).

Deste modo, foram surgindo entidades reguladoras e legislações que estabelecem normas e regulamentação com o objetivo de garantir os direitos e a segurança do consumidor.

No final da década de 60 foi desenvolvido o sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo*) pela companhia americana Pillsbury em conjunto com a NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) e o U. S. Army Laboratories em Natick, para o programa espacial da NASA Projeto APOLO, com o objetivo de garantir a segurança do fornecimento de alimentos aos astronautas da NASA. O sistema HACCP pretende evitar potenciais riscos que possam causar dano aos consumidores, através da eliminação ou redução dos perigos, de modo a garantir que todos os alimentos disponibilizados aos consumidores sejam seguros. Este sistema baseia-se na aplicação ordenada de sete princípios técnicos e científicos, entre eles a identificação dos perigos, a identificação dos pontos críticos de controlo (PCC), o estabelecimento de limites críticos para cada medida associada a um PCC, a monitorização dos PCC, o estabelecimento de medidas corretivas para os casos de desvio dos limites críticos, a verificação dessas medidas e por fim a criação de um sistema de registo para todos os controlos efetuados. Este sistema deve ser aplicado ao longo de toda a cadeia alimentar, ou seja, desde “o prado até ao prato” (ASAE, 2007).

O *Codex Alimentarius*, expressão em latim para Código ou Lei dos Alimentos, consiste num conjunto de normas alimentares internacionais e foi criado pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) em conjunto com a *World Health Organization* (WHO), com o objetivo de proteger a saúde dos consumidores e assegurar que as práticas do comércio de alimentos sejam justas. De acordo com o *Codex Alimentarius* todas as pessoas têm o direito de esperar que os alimentos que consomem sejam inócuos e em boas condições para consumo (WHO/FAO, 2003).

Em 2002 surgiu a *European Food Safety Authority* (EFSA) financiada pela União Europeia, que opera independentemente das instituições legislativas e executivas europeias (Comissão, Conselho, Parlamento) e dos Estados-Membros da União Europeia. A sua função é fornecer aconselhamento científico independente e comunicação dos riscos associados à cadeia alimentar. As atividades da EFSA são guiadas por um conjunto de valores, nomeadamente a excelência científica, a independência, a transparência, a inovação e a cooperação (EFSA, 2018).

Em 2004 criou-se o Regulamento (CE) N° 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, que estabelece um conjunto de normas gerais de higiene dos géneros alimentícios, que se destina aos operadores de empresas do setor alimentar, de modo a garantir a segurança alimentar dos consumidores.

Em 2005 foi fundada a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), responsável pela fiscalização das áreas alimentar e económica em Portugal.

Todos estes programas e entidades, ainda que distintos uns dos outros, têm o objetivo comum de garantir a segurança alimentar dos consumidores, de modo a evitar possíveis danos na saúde causados pela alimentação.

## **I.2. Perigos de origem alimentar**

Existem mais de 250 tipos de doenças de origem alimentar, sendo que a maioria delas são causadas por microorganismos patogénicos e podem causar graves problemas de saúde pública. As doenças resultantes da ingestão de alimentos contaminados designam-se por doenças transmitidas por alimentos (DTA), doenças veiculadas por alimentos (DVA) ou toxinfecções, podendo ser identificadas quando uma ou mais pessoas apresentam sintomas semelhantes após a ingestão de alimentos contaminados com microorganismos patogénicos, toxinas, substâncias químicas tóxicas ou objetos lesivos provenientes de uma fonte comum (Oliveira *et al.*, 2010).

A Comissão do *Codex Alimentarius* definiu o conceito de perigo em alimentos como qualquer propriedade biológica, física ou química que possa tornar um alimento prejudicial para consumo humano. A *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF) definiu este conceito de forma mais detalhada, como qualquer contaminação ou crescimento inaceitável, ou sobrevivência de bactérias em alimentos que possam afetar a sua inocuidade ou qualidade (deterioração), ou a produção ou persistência de substâncias como toxinas, enzimas ou produtos resultantes do metabolismo microbiano em alimentos (Baptista e Venâncio, 2003).

Quanto à sua natureza, os perigos de origem alimentar podem ser classificados em três categorias: perigos biológicos, perigos químicos e perigos físicos (Tabela 1). Os perigos biológicos são os que apresentam maior risco à inocuidade dos alimentos e incluem as bactérias, fungos, vírus, parasitas e priões. Estão normalmente associados à manipulação dos alimentos pelos operadores ou à utilização de produtos crus contaminados, ocorrendo naturalmente no ambiente onde os alimentos são produzidos. A melhor forma de os controlar é a utilização de boas práticas de higiene na manipulação, armazenamento e fabrico dos alimentos. Os perigos químicos podem ser de vários tipos e ter origens diversas, desde perigos diretamente associados às próprias matérias primas, perigos resultantes da contaminação das matérias primas, ou perigos criados ou introduzidos durante o processamento. Por fim, os perigos físicos são normalmente objetos presentes nos alimentos e podem também ter diversas origens, como estar já presentes nas matérias primas ou ser introduzidos nos alimentos através da manipulação ao longo dos processos (Baptista e Venâncio, 2003).

**Tabela I.** Perigos de origem alimentar e respetivos agentes (Adaptado de Baptista e Venâncio, 2003 e ASAE, 2018).

<b>Tipos de perigo</b>	<b>Agentes</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Biológicos</b>	Bactérias Fungos Vírus Parasitas Priões	<i>Salmonella, Campylobacter jejuni</i> Bolors e leveduras Rotavírus, vírus da hepatite A <i>Toxoplasma, Giardia</i> Agente da BSE
<b>Químicos</b>	Aditivos alimentares Pesticidas químicos Medicamentos veterinários Metais pesados Toxinas naturais Alergénios Substâncias naturais vegetais Químicos de processamento	Corantes, conservantes, antioxidantes Inseticidas, fungicidas, herbicidas Antibióticos, promotores de crescimento Chumbo, cobre, mercúrio Toxinas de marisco ou cogumelos Glúten, lactose Solanina em batata, hemaglutinina Desinfetantes, lubrificantes
<b>Físicos</b>	Objetos	Vidro, madeira, pedras, metais, materiais de isolamento e revestimento, ossos, plástico, objetos de uso pessoal

Relativamente aos perigos biológicos, os microorganismos presentes nos alimentos usam-os como fonte de nutrientes, levando à sua degradação e tornando-os impróprios para consumo. Nos casos em que a degradação dos alimentos ainda não é visível mas já se encontram contaminados, o seu consumo pode gerar doenças no consumidor, podendo mesmo, em situações extremas, levar à morte (Baptista e Venâncio, 2003).

Estima-se que cerca de 90 % das doenças transmitidas por alimentos tenham origem biológica, ou seja, são causadas por microorganismos. São conhecidos mais de 250 tipos diferentes de bactérias, vírus e parasitas causadores de doenças de origem alimentar, sendo alguns deles mais frequentes do que outros. Estes microorganismos podem estar presentes em quase todos os tipos de alimentos, mas a sua presença deve-se normalmente a práticas erradas nas etapas de confeção, conservação e distribuição ou a manipulação inadequada (ASAE, 2018 e Oliveira *et al*, 2010).

Algumas das doenças de origem alimentar causadas por microorganismos têm sido descobertas recentemente, o que pode ser explicado pela sua facilidade de difusão pelo

mundo, pelas modificações a nível do ambiente e ecologia, dos hábitos de produção e consumo de alimentos e pelos avanços na tecnologia que permitem identificar microorganismos que antes eram indetetáveis. Contudo, os avanços na elaboração e manipulação de alimentos, como por exemplo a pasteurização do leite e a desinfecção da água, permitem controlar muitas destas doenças (ASAE, 2018).

Muitos dos surtos ocorrem devido à ingestão de alimentos com boa aparência, sabor e odor normais, sem qualquer alteração organolética visível, uma vez que a dose infetante de patógenos alimentares geralmente é menor que a quantidade de microorganismos necessária para degradar os alimentos. Isto dificulta a rastreabilidade dos alimentos causadores de surtos, uma vez que os consumidores afetados têm dificuldade em identificar quais os alimentos responsáveis. Os alimentos com características organoléticas alteradas dificilmente causam surtos alimentares porque são rejeitados pelos consumidores, sendo que nestas situações a contaminação microbiana é elevada, muitas vezes ultrapassando números da ordem de 10<sup>8</sup> UFC/g de alimento. Deste modo, o hábito de “provar para ver se está bom” pode ser bastante perigoso (Oliveira *et al.*, 2010).

A maioria dos casos de doenças de origem alimentar, tanto a nível nacional como a nível internacional, não são notificados às autoridades sanitárias, isto porque muitas das vezes os sintomas são brandos e a vítima não sente necessidade de procurar ajuda médica. Em muitos países apenas são notificados os surtos que envolvam um grande número de pessoas ou quando a duração dos sintomas é mais prolongada (Oliveira *et al.*, 2010).

Apesar da dificuldade associada ao registo das doenças transmitidas por alimentos, tem-se verificado um aumento, que pode dever-se ao aumento da população e dos grupos populacionais mais vulneráveis, à urbanização muitas vezes desordenada, à produção e consumo de alimentos em condições inadequadas, ao aumento da produção de alimentos e do comércio internacional, à melhoria dos sistemas de vigilância epidemiológica e à melhoria dos métodos de diagnóstico e estrutura laboratorial para análises (Oliveira *et al.*, 2010).

### **1.3. Parasitoses de origem alimentar**

As parasitoses de origem alimentar são doenças causadas por parasitas protozoários e helmintas (Tabela 2) (Fernandes *et al.*, 2012).

Os parasitas são organismos que vivem na dependência de outro organismo, o hospedeiro, o qual é prejudicado nesta associação. As doenças de origem alimentar causadas por parasitas são muito menos frequentes do que as de origem bacteriana, no entanto, os

parasitas atingem tamanhos muito superiores aos das bactérias, podendo crescer e atingir o estado adulto no trato gastrointestinal do Homem (ASAE, 2018).

Os principais protozoários parasitas intestinais causadores de doenças de origem alimentar são *Giardia lamblia* (ou *G. intestinalis*), *Cryptosporidium parvum*, e *Cyclospora cayetanensis*. No caso dos helmintas os mais frequentes são *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Ancilostomas* (Fernandes et al., 2012).

Os sintomas mais comuns de parasitoses alimentares são vômitos, dor abdominal e diarreia, e em certos casos podem durar várias semanas, após as quais desaparecem ou diminuem, podendo posteriormente reaparecer (Fernandes et al., 2012).

As parasitoses alimentares são mais frequentes em países subdesenvolvidos, podendo atingir um índice de até 90%, aumentando a sua frequência à medida que piora o nível socioeconómico (Ludwig et al., 1999).

As parasitoses constituem um grave problema de saúde pública, principalmente nos países de terceiro mundo e são um dos principais fatores debilitantes da população, estando muitas vezes associadas a diarreia crónica e desnutrição, comprometendo assim o desenvolvimento físico e intelectual da população, especialmente das faixas etárias mais jovens (Ludwig et al., 1999).

**Tabela 2.** Parasitas associados a doenças de origem alimentar (Adaptado de ASAE, 2018).

<b>Género</b>	<b>Espécies</b>	<b>Alimentos mais frequentemente associados</b>	<b>Alimentos notificados no RASFF* (Março a Agosto 2016)</b>
<i>Cryptosporidium</i>	<i>C. parvum</i>	Leite, água, vegetais	
<i>Cyclospora</i>	<i>C. cayetanensis</i>	Água e alimentos contaminados com fezes	
<i>Entamoeba</i>	<i>E. histolytica</i>	Água, frutos e vegetais	
<i>Giardia</i>	<i>G. lamblia</i> (ou <i>G. intestinalis</i> )	Alimentos ou água expostos a contaminação fecal	
<i>Anisakis</i>	<i>A. simplex</i>	Salmão, bacalhau, badejo, arenques, etc. (músculo de muitos peixes)	Bacalhau seco, sardas, tamboril
<i>Ascaris</i>	<i>A. lumbricoides</i>	Frutos e vegetais	
<i>Diphyllobothrium</i>	<i>D. latum</i>	Salmão e outros peixes	
<i>Taenia</i>	<i>T. saginata</i> <i>T. solium</i>	Bovinos Porco	
<i>Trichinella</i>	<i>T. spirallis</i>	Javali, porco (músculo de animais carnívoros)	

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

As parasitoses de origem alimentar estão normalmente associadas a produtos mal cozinhados ou a alimentos prontos a consumir que se encontram contaminados. A congelação pode ser uma forma eficaz de matar os parasitas presentes nos alimentos (Baptista e Venâncio, 2003). A transmissão de parasitas entre animais e humanos é também facilitada pelas águas contaminadas (Watanabe et al., 2005).

Existem determinados fatores que podem contribuir para a ocorrência de parasitoses alimentares (à semelhança do que acontece com bactérias e vírus), nomeadamente características inerentes ao parasita, a dose infetante e as características do hospedeiro. Entre

as características do parasita encontram-se a variabilidade de expressão dos mecanismos patogénicos, o potencial para causar doença, a sensibilidade às condições ambientais envolventes (pH, atividade da água, concentração de sal, temperatura) e a natureza das interações com outros organismos. A dose infetante consiste no número mínimo de microorganismos necessário para causar a doença, podendo variar de indivíduo para indivíduo, sendo necessário também ter em conta que existem determinados grupos de risco, como crianças, idosos, grávidas e imunodeprimidos, para os quais esta dose poderá ser menor. Quanto às variáveis do hospedeiro incluem-se a idade, a condição física e estado de saúde, o estado nutricional, o tipo de atividade profissional, a medicação a que pode estar sujeito, o nível de funcionamento do sistema digestivo e variação da acidez gástrica, a quantidade de alimentos consumidos e a possível existência de distúrbios genéticos (Baptista e Venâncio, 2003).

Devido aos seus efeitos ao nível da saúde, têm sido dirigidos vários programas de controlo destas parasitoses em diferentes países. No entanto, o sucesso atingido nos países em desenvolvimento não alcança o sucesso atingido nos países desenvolvidos. A implementação de ações de controlo é dificultada tanto pelo custo financeiro das medidas técnicas como pela falta de projetos educativos que envolvam a comunidade. Além da melhoria das condições socioeconómicas e da infraestrutura geral, o envolvimento comunitário é um dos aspetos fundamentais para a implementação, desenvolvimento e sucesso dos programas de controlo (Ludwig *et al.*, 1999).

Os parasitas *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.* estão entre os principais protozoários parasitas intestinais causadores de diarreia, apresentando frequentemente manifestações clínicas semelhantes (Verweij *et al.*, 2004).

### **1.3.1. *Giardia lamblia***

*Giardia sp.* é um protozoário parasita pertencente ao Filo Sarcomastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Diplomonadida, Família Hexamitidae e Género *Giardia* (Thompson *et al.*, 2000).

Existem oito espécies de *Giardia*, com diferentes hospedeiros, sendo *Giardia lamblia*, também designada por *Giardia duodenalis* ou *Giardia intestinalis*, a única que infeta o Homem (Tabela 3) (Adam, 2001, Hillman *et al.*, 2016 e Lyu *et al.*, 2018).

**Tabela 3.** Espécies de *Giardia* e respectivos hospedeiros (Adaptado de Adam, 2001, Hillman *et al.*, 2016 e Lyu *et al.*, 2018).

<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro</b>
<i>Giardia lamblia</i> (ou <i>G. duodenalis</i> ou <i>G. intestinalis</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 cricetidarum</i>	Hamsters

Em relação às características genéticas, *G. lamblia* é uma espécie complexa com oito genótipos (A-H), mas apenas dois, os genótipos A e B infetam os humanos (Tabela 4) (Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010).

**Tabela 4.** Genótipos de *Giardia lamblia* e respectivos hospedeiros (Adaptado de Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010).

<b>Genótipo (assemblage)</b>	<b>Hospedeiro</b>
A	Humanos, primatas, gado, cão, cavalo, gato, porco, veado, alce, castor
B	Humanos, primatas, gado, cão, cavalo, coioote, chinchila, castor, rato
C	Cão e outros canídeos
D	Cão e outros canídeos
E	Gado (bovinos, caprinos, suínos e alpaca)
F	Gato
G	Rato
H	Mamíferos marinhos

Os genótipos A e B estão divididos em sub-genótipos: o sub-genótipo AI infeta preferencialmente animais; o AII é mais comum em humanos; o AIII infeta exclusivamente animais; os sub-genótipos BIII e BIV são mais comuns em humanos mas por vezes também infetam animais (Ryan e Cacciò, 2013).

*Giardia lamblia* é um dos protozoários parasitas intestinais humanos mais frequentemente relatados em todo o mundo, com taxas de prevalência de aproximadamente 20 a 30 % nos países em desenvolvimento e 2 a 5 % nos países desenvolvidos. Apresenta uma distribuição global, no entanto é mais comum nos países em desenvolvimento (Feng e Xiao, 2011). Nos países desenvolvidos as infecções ocorrem mais frequentemente em crianças, principalmente as que frequentam creches, em homossexuais, em indivíduos institucionalizados e em viajantes (Nash *et al.*, 1987). *G. lamblia* é o protista parasitário mais prevalente nos Estados Unidos da América, podendo atingir uma incidência de 0,7 % (Morrison *et al.*, 2007).

Este protozoário provoca no Homem uma doença designada por giardíase, sendo mais comum entre pessoas com pouca higiene, uma vez que a transmissão é fecal-oral. As principais formas de transmissão são o abastecimento de água contaminada e determinadas práticas sexuais (Morrison *et al.*, 2007).

A infecção por *G. lamblia* ocorre devido à ingestão de quistos, através do contacto direto pessoa-pessoa ou pessoa-animal, ou através da ingestão de água ou alimentos contaminados, uma vez que os quistos são capazes de sobreviver longos períodos no meio ambiente e são resistentes aos níveis de cloro utilizados no tratamento de águas (Robertson *et al.*, 2010). Em humanos, a dose infetante varia entre 10 a 100 quistos (Almeida *et al.*, 2010).

Em 2004, a giardíase foi incluída na lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (Savioli *et al.*, 2006).

Os principais sintomas são diarreia com ou sem má absorção, náuseas, vômitos, flatulência e cólicas abdominais, podendo por vezes ocorrer perda de peso e fezes gordurosas embora muitas das infecções sejam assintomáticas. A giardíase apresenta um período de incubação de 1 a 4 semanas, após os quais podem aparecer os sintomas (Nash *et al.*, 1987, Ford, 2005, Feng e Xiao, 2011 e Castro, 2001).

A giardíase humana pode ser dividida em duas fases da doença, a fase aguda, normalmente de curta duração, que se caracteriza por flatulência, distensão abdominal e diarreia, e a fase crónica, na qual ocorre má absorção, perda de peso e mau estar (Ford, 2005). Em muitas crianças ocorre desnutrição, problemas a nível de crescimento e de peso, provavelmente associados à desnutrição e, ainda, atrasos a nível cognitivo, de inteligência e de desenvolvimento psicossocial e motor (Feng e Xiao, 2011).

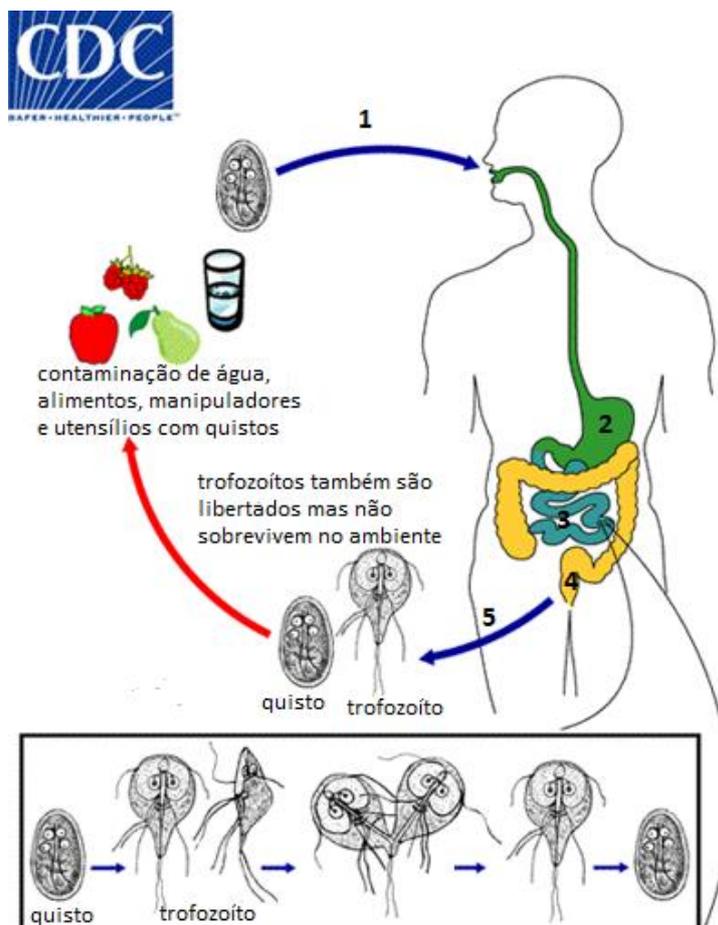
Apesar da maioria dos casos de giardíase ser esporádica, estão documentados vários surtos em todo o mundo, principalmente transmitidos pela água potável e águas recreativas. Além da água, muitos dos surtos também tiveram origem em alimentos contaminados, principalmente vegetais, podendo a contaminação ocorrer ao nível da produção ou através

dos manipuladores de alimentos, que estavam infetados ou que tiveram contacto com quistos infecciosos antes da preparação dos alimentos. A maioria dos surtos descritos ocorreram na América do Norte e na Europa, devido a melhores sistemas de vigilância e informação (Feng e Xiao, 2011).

A giardíase é considerada uma doença zoonótica porque *G. lamblia* também infeta uma grande variedade de animais, podendo estes funcionar como reservatórios do parasita (Feng e Xiao, 2011).

*Giardia lamblia* possui um ciclo de vida monoxeno, porque necessita apenas de um hospedeiro para completar o seu ciclo, e é um parasita eurixeno, porque é capaz de infetar diferentes espécies de animais (Figura 1).

O ciclo de vida alterna entre duas formas morfológicamente distintas, os quistos e os trofozoítos. Os quistos são formas resistentes e são infecciosos imediatamente após serem libertados nas fezes, sendo responsáveis pela transmissão de giardíase. São ovóides e contêm quatro núcleos, habitualmente reunidos num dos pólos. Após a libertação nas fezes disseminam-se através de água, alimentos, fómites ou por contacto físico direto. Podem permanecer infecciosos durante meses em locais frios e húmidos, acumulando-se rapidamente no ambiente (Feng e Xiao, 2011). A infeção ocorre pela ingestão de quistos através de água ou alimentos contaminados ou por via direta fecal-oral. No intestino delgado, cada quisto produz dois trofozoítos, que se multiplicam por fissão binária longitudinal, colonizando o intestino delgado proximal, podendo estar livres no lúmen ou aderentes à mucosa através do disco de sucção ventral (CDC, 2017a). O desenquistamento ocorre devido à passagem pelo pH ácido do estômago e elevada concentração de CO<sub>2</sub>, seguido de um ambiente ligeiramente alcalino (Ford, 2005). Os trofozoítos são a fase reprodutiva e são responsáveis por causar os sintomas (Adam, 2001 e Ford, 2005). Morfológicamente, o trofozoíto é piriforme, apresenta simetria bilateral, possui dois núcleos que se dispõem simetricamente na região anterior, duas fibras longitudinais, dois corpos parabasais, quatro pares de flagelos e um grande disco de sucção ou ventosa (Hill, 2001). O enquistamento, ou seja, formação do quisto, ocorre à medida que os trofozoítos passam pelo trato intestinal alcalino (Ford, 2005). O quisto é o estágio mais comumente encontrado nas fezes não diarreicas e são eliminados esporadicamente, podendo o seu número variar de um dia para o outro (Garcia e Shimizu, 1997). Como os quistos são infecciosos quando excretados nas fezes pode ocorrer transmissão de pessoa para pessoa (CDC, 2017a).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. 1 – ingestão de quistos através de água, alimentos, mãos ou utensílios contaminados; 2 – o quisto é exposto ao pH ácido do estômago; 3 – ocorre desenquistamento e são libertados dois trofozoítos no intestino delgado, onde ocorre reprodução assexuada; 4 – os trofozoítos transformam-se em quistos e são libertados nas fezes; 5 – eliminação das formas parasitárias nas fezes (Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) [www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html](http://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html)).

A prevenção de giardíase engloba a adoção de boas práticas de higiene e evitar a ingestão de água ou alimentos que possam estar contaminados. Para controlar esta parasitose é importante proceder ao tratamento imediato das pessoas infetadas e identificar os reservatórios animais, de modo a proceder também ao seu tratamento.

### 1.3.2. *Cryptosporidium sp.*

*Cryptosporidium sp.* é um protozoário parasita do Filo Apicomplexa, que apresenta uma distribuição cosmopolita e pode infetar uma grande variedade de espécies animais, incluindo animais domésticos, vertebrados selvagens e o Homem (Lallo e Bondan, 2005 e Xiao et al., 1999).

Existem 26 espécies e mais de 40 genótipos no género *Cryptosporidium*, sendo algumas espécies responsáveis pela infeção no Homem, nomeadamente *C. parvum*, *C. hominis*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. muris*, *C. baileyi* e *C. suis*. As espécies mais frequentemente encontradas no Homem são *C. parvum* e *C. hominis* (Tabela 5). No entanto, a prevalência varia em diferentes partes do mundo, sendo *C. hominis* a espécie mais comum na América do Norte, América do Sul, Austrália e África, e *C. parvum* a espécie mais frequente no continente europeu (Araújo, 2015). A espécie *C. hominis* é a mais comum em humanos e a espécie *C. parvum*, além de ser também uma das mais frequentes em humanos, é a mais comum em animais, infetando uma ampla variedade de espécies (Pérez-Cordón *et al.*, 2016). O genótipo de *C. parvum* que infeta o Homem é chamado de genótipo humano ou genótipo II (Carvalho, 2019).

**Tabela 5.** Exemplos de espécies de *Cryptosporidium* e principais hospedeiros (Adaptado de Xiao *et al.*, 1999 e Thompson e Ash, 2016).

<b>Espécie</b>	<b>Principais hospedeiros</b>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Mamíferos incluindo o Homem
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Primatas incluindo o Homem
<i>Cryptosporidium felis</i>	Gato
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Aves
<i>Cryptosporidium canis</i>	Cão
<i>Cryptosporidium cuniculus</i>	Coelho e Homem
<i>Cryptosporidium muris</i>	Roedores
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Aves
<i>Cryptosporidium suis</i>	Suínos
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Répteis
<i>Cryptosporidium nasorum</i>	Peixes
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Porquinho da Índia
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Bovinos
<i>Cryptosporidium viatorum</i>	Homem
<i>Cryptosporidium ubiquitium</i>	Caprinos
<i>Cryptosporidium tyzzeri</i>	Roedores
<i>Cryptosporidium scrofarum</i>	Suínos
<i>Cryptosporidium pestis</i>	Gado

O parasita *Cryptosporidium sp.* causa uma doença designada por criptosporidiose, sendo normalmente a água contaminada a fonte mais comum de transmissão (Gamba *et al.*, 2000). O parasita infeta as células intestinais causando diarreia aguda autolimitada em hospedeiros imunocompetentes, e diarreia crónica grave e prolongada em hospedeiros imunocomprometidos, sendo responsável por até 20 % dos casos de diarreia infantil nos países em desenvolvimento (Carvalho-Almeida *et al.*, 2006). A criptosporidiose é uma infeção oportunista, aproveitando a fragilidade do organismo (Thompson *et al.*, 2016).

Os sintomas mais frequentes de criptosporidiose são diarreia, diarreia aquosa, náuseas, vómitos, febre e dor abdominal, mas podem também ocorrer infeções assintomáticas (Rehn *et al.*, 2015). Os sintomas surgem entre 2 a 10 dias após a contaminação e duram normalmente uma a duas semanas, sendo que em indivíduos imunocompetentes a recuperação normalmente é fácil, mas no caso dos imunodeprimidos a infeção pode ser mais grave e persistente e invadir sistemas de órgãos, com risco de vida (Rehn *et al.*, 2015).

A principal forma de transmissão é a via fecal oral, podendo esta transmissão ser direta, por contacto pessoa-pessoa ou pessoa-animal, ou indireta, por ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos (Rehn *et al.*, 2015). Na maioria dos casos deve-se ao contato com água contaminada, tendo muitos dos surtos ocorrido em parques aquáticos, piscinas comunitárias ou creches (CDC, 2017b). Existem ainda vários dados epidemiológicos que demonstram uma forte ligação entre o contacto com gado infetado e infeções humanas (Hunter e Thompson, 2005).

O parasita apresenta uma baixa dose infetante ( $\leq 10$  oocistos), podendo os oocistos infecciosos continuar a ser libertados até 60 dias após o desaparecimento dos sintomas gastrointestinais (Araújo, 2015).

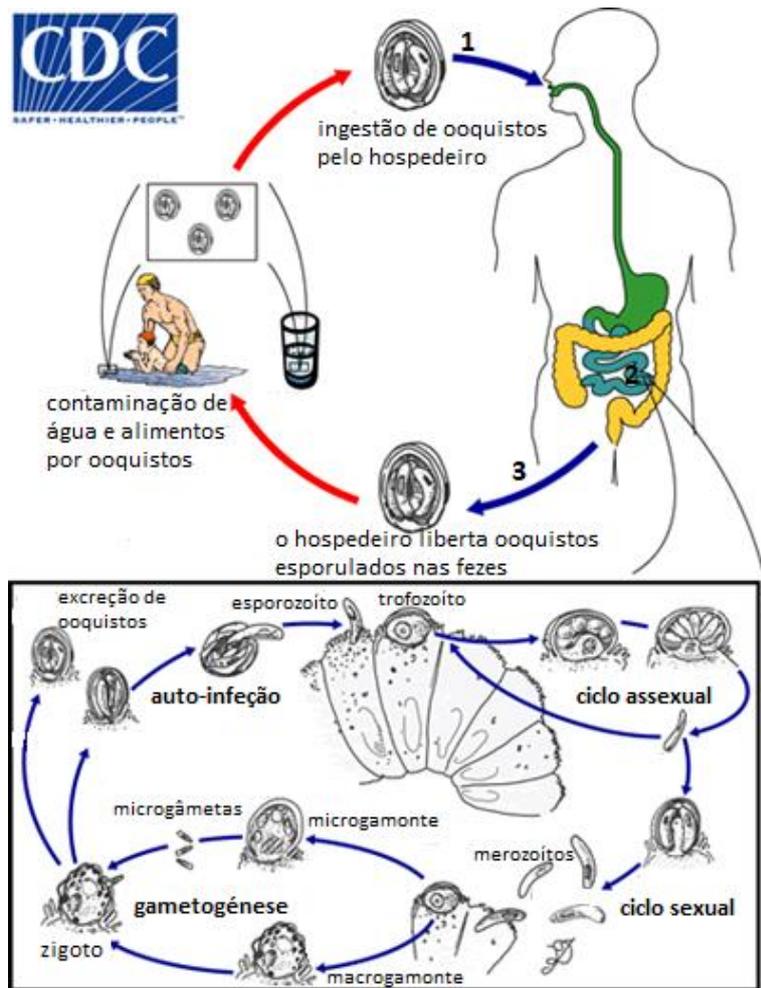
A infeção por *Cryptosporidium* no Homem foi documentada pela primeira vez em 1976 e desde então o protozoário passou a ser conhecido como causa de doença gastrointestinal tanto em imunocompetentes como em imunodeprimidos (MacKenzie *et al.*, 1994).

O interesse na criptosporidiose humana começou no início dos anos 80, classificando-se como uma doença patogénica zoonótica, com potencial de transmissão de pessoa para pessoa. Esse interesse teve origem na ocorrência de surtos normalmente associados a visitas a fazendas ou outros locais com animais, bem como à contaminação de água potável (Hunter e Thompson, 2005).

Em 1993, foi responsável pelo maior surto diarreico num país desenvolvido, em Milwaukee, nos EUA, registando-se aproximadamente 403000 casos devido à ingestão de água contaminada (Mac Kenzie *et al.*, 1994).

*Cryptosporidium sp.* é considerado um patógeno emergente e está incluído na lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial de Saúde desde 2004 (Savioli *et al.*, 2006).

O seu ciclo de vida é monoxeno, porque necessita apenas de um hospedeiro para o completar, eurixeno, porque pode infectar diferentes espécies, e é um ciclo complexo, incluindo fases de reprodução sexuada e assexuada (Figura 2). O hospedeiro infectado excreta ooquistos esporulados, através das fezes ou outras vias, que contêm quatro esporozoítos cada. São arredondados, medem cerca de 3 a 8 micrómetro de diâmetro e têm capacidade infecciosa (Pereira *et al.*, 2009). Após ingestão ou inalação por um hospedeiro adequado, os esporozoítos são libertados e parasitam as células epiteliais do trato gastrointestinal ou outros tecidos. Nestas células, os parasitas sofrem multiplicação assexuada e depois multiplicação sexuada produzindo microgâmetas e macrogâmetas. Após a fertilização dos macrogâmetas pelos microgâmetas, desenvolvem-se os ooquistos, que esporulam no hospedeiro infectado. São produzidos dois tipos diferentes de ooquistos, os de parede espessa, que são comumente excretados pelo hospedeiro, e os de parede fina, que estão envolvidos na autoinfecção. Os ooquistos são infecciosos após excreção e são muito resistentes podendo sobreviver no ambiente por longos períodos de tempo, sendo transmitidos por via fecal oral de pessoa para pessoa ou através do consumo de água ou alimentos contaminados (Thompson *et al.*, 2016 e CDC, 2017b). A elevada resistência dos ooquistos a condições de stress e a tratamentos, como por exemplo a desinfecção química, deve-se essencialmente à sua parede formada por uma matriz de proteínas, lípidos e carboidratos, que funciona como uma barreira protetora e permite ao parasita permanecer estável fora do hospedeiro (Plutzer e Karanis, 2009).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Cryptosporidium sp.* 1 – ingestão de ooquistos através de água e alimentos contaminados; 2 – no intestino delgado ocorre desenquistamento e multiplicação sexual e assexuada, desenvolvendo-se ooquistos esporulados; 3 – liberação dos ooquistos esporulados nas fezes (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html](http://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html)).

A criptosporidiose humana ocorre essencialmente em pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), em viajantes e em creches, ou como resultado de um surto de origem hídrica, sendo a infecção sintomática mais comum em crianças do que em adultos (Carvalho-Almeida *et al.*, 2006).

A sua elevada prevalência deve-se não só à baixa dose infetante necessária para multiplicação no hospedeiro, mas também à sua capacidade de permanecer no ambiente por longos períodos de tempo e à sua elevada resistência aos processos convencionais de tratamento de água. *Cryptosporidium sp.* não se multiplica nos alimentos, mas pode sobreviver durante longos períodos de tempo em ambientes frios e com elevado teor de humidade (Araújo, 2015).

A prevenção da contaminação por *Cryptosporidium sp.* passa essencialmente por garantir práticas de higiene rigorosas na manipulação de alimentos, evitar o consumo de água

e alimentos que possam estar contaminados e minimizar a disseminação de oocistos ao nível da produção primária e no tratamento dos resíduos.

#### **I.4. Surtos alimentares associados a saladas embaladas prontas a consumir**

Os vegetais folhosos são componentes essenciais da dieta e o seu consumo regular em quantidades adequadas pode prevenir o aparecimento de doenças cardiovasculares e alguns tipos de cancro. São incluídos no grupo dos alimentos prontos a consumir porque não é necessário cozinhar ou usar qualquer outra medida que leve à redução ou eliminação de microrganismos (Chaves *et al.*, 2016).

O consumo de vegetais crus, nomeadamente de saladas, é recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) e pela Direção Geral de Saúde (DGS), devido aos benefícios que trazem à saúde humana, sendo uma parte fundamental de uma alimentação saudável e por isso devem ser consumidos diariamente. Estes alimentos são fontes insubstituíveis de minerais como potássio, zinco, cálcio, magnésio, cobre, entre outros, de algumas vitaminas, especialmente de vitamina C e de diversos compostos protetores como os flavenóides (Coimbra, 2015). Os legumes e saladas frescas são altamente recomendados na alimentação diária como principal fonte de fitoquímicos e fibras (Yamoudy *et al.*, 2015).

A *World Health Organization* (WHO), entre outras autoridades da saúde, recomendam o consumo de 400 g de legumes e fruta por dia, distribuídos em cinco porções, para diminuir o número de doenças crónicas não transmissíveis, que causam cerca de 2,7 milhões de mortes por ano (Moura, 2016).

O consumo de vegetais prontos a consumir está muito associado a uma sociedade cada vez mais globalizada, onde as pessoas têm o seu tempo limitado e sentem a necessidade de alterar os seus hábitos e optam por soluções mais fáceis e rápidas, tentando, porém, manter uma alimentação saudável (Coimbra, 2015).

O aumento da participação da mulher no mercado de trabalho faz com que esta tenha menos tempo disponível para a compra e preparação de produtos hortícolas para as refeições, levando-a a procurar opções mais práticas e rápidas. Além disso, a crescente preocupação dos consumidores com a saúde, associada à diminuição do tamanho das famílias, fazem com que o consumidor se torne mais consciente e exigente (Silva *et al.*, 2011).

As saladas embaladas prontas a consumir são uma opção muito atraente para consumidores que procuram refeições saudáveis e convenientes, no entanto são também uma preocupação do ponto de vista da segurança microbiológica (Oliveira, 2011). Nos últimos 10 anos, tem aumentado a procura de vegetais verdes folhosos e saladas prontas a consumir, isto porque as pessoas têm alterado os seus hábitos alimentares devido a uma maior preocupação com a saúde e a mudanças no seu estilo de vida. No entanto, estes vegetais e saladas prontas a consumir são conhecidas como fonte de surtos de intoxicação alimentar em muitas partes do mundo (Taban e Halkman, 2011). O aumento do consumo de verduras cruas prontas a consumir leva conseqüentemente ao aumento do risco de transmissão de parasitas através destes produtos, visto que a maioria das medidas de controlo, como lavagem e desinfecção, têm como objetivo reduzir a contaminação bacteriana, mas são ineficazes na remoção ou inativação de quistos e ooquistos infecciosos de parasitas como *G. lamblia* e *Cryptosporidium* sp. (Lalonde e Gajadhar, 2016). As verduras, como é o caso das saladas verdes, são fontes potenciais de microorganismos patogénicos, sendo frequentemente associadas a doenças de origem alimentar (DTA) (Santos et al., 2010). Os dados microbiológicos existentes sugerem que os vegetais de folhas verdes são os que constituem uma maior preocupação a nível de contaminação microbiológica (Tabela 6) (Coimbra, 2015).

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

<b>Tipo de vegetal</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Ano</b>	<b>Localização</b>
Alface	<i>Escherichia coli</i>	1995	EUA
	<i>Listeria monocytogenes</i>	1979	EUA
	<i>Shigella sonnei</i>	1983	EUA
	<i>Salmonella typhimurium</i>	1994	Noruega
	<i>Salmonella Newport</i>	2005	Espanha
	<i>Campylobacter jejuni</i>	1996	EUA
Folha de alface “baby”	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1997	EUA
Alface picada	<i>Shigella sonnei</i>	1986	EUA
Alface iceberg	<i>Shigella sonnei</i>	1994	Noruega, Suécia e Reino Unido
	<i>Escherichia coli</i>	1995	Canadá
Salada de alface	<i>Vírus da Hepatite A</i>	1986	EUA
	<i>Giardia</i>	1989	EUA
Salsa	<i>Shigella sonnei</i>	1998	EUA
Manjeriço	<i>Salmonella senftenberg</i>	2007	Israel
	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1997	EUA

O aumento do consumo dos produtos minimamente processados, tanto a nível doméstico como a nível institucional, bem como a elevada manipulação a que são sujeitos, fez com que aumentasse a preocupação com o risco potencial para a saúde pública devido à probabilidade de contaminação microbiológica (Santos *et al.*, 2010). Deste modo, a segurança e qualidade microbiológica dos vegetais minimamente processados têm sido alvo de preocupação nas últimas décadas, devido à associação a surtos de origem alimentar, relacionados com o consumo de vegetais crus, principalmente os vegetais de folhas verdes (Moura, 2016).

Surtos recentes de doenças transmitidas por alimentos na Europa e nos EUA mostram que existe ligação entre alguns patógenos e algumas verduras folhosas e suas saladas prontas a consumir. O risco potencial de contaminação microbiológica associado aos vegetais verdes folhosos pode dever-se ao uso de água de irrigação não tratada, ao uso de fertilizantes orgânicos inadequados, à vida selvagem, ou a outras fontes que podem ocorrer do “prado ao prato”, como falhas durante a colheita, manuseamento, processamento e empacotamento (Taban e Halkman, 2011).

As saladas embaladas prontas a consumir são consideradas produtos minimamente processados, isto porque, apesar de terem sido fisicamente alterados, permanecem em estado fresco e não necessitam de preparação para consumo. Este processamento mínimo inclui etapas de seleção e classificação da matéria prima, pré-lavagem, processamento que pode envolver corte e fatiamento, sanificação, lavagem, centrifugação e embalamento. Muitas destas operações são manuais e aumentam a possibilidade de contaminação por microorganismos patogénicos, que, além de diminuírem a vida útil do produto, também colocam em risco a saúde do consumidor (Fonseca *et al.*, 2009 e Santos *et al.*, 2010). A contaminação por parasitas protozoários pode ocorrer por várias formas, nomeadamente contaminação do alimento ou equipamento durante a colheita, acondicionamento, transporte ou preparação, diretamente através do manipulador, ou através da utilização de água contaminada para irrigação das culturas, para misturar pesticidas ou para lavar os produtos. Vários estudos têm identificado a água de irrigação como fonte de contaminação, tendo já sido detetados parasitas (Dixon, 2013). As etapas pelas quais estes produtos passam têm como objetivo prolongar a sua vida útil e preservar os seus nutrientes e propriedades, no entanto, podem não ser eficazes na eliminação de todos os microorganismos presentes (Oliveira, 2011).

As saladas podem ser consumidas em escolas, creches, casas de detenção, hospitais, serviços de *catering*, serviços de *fast food*, restaurantes e supermercados, podendo, deste modo, chegar a todos os consumidores (Fonseca *et al.*, 2009).

O risco de desenvolver complicações devido à ingestão de vegetais verdes folhosos contaminados, incluindo as saladas prontas a consumir, é superior no caso de crianças, idosos, mulheres grávidas e indivíduos imunocomprometidos, que são considerados grupos de risco (Taban e Halkman, 2011).

Vários estudos de vigilância para examinar a prevalência de parasitas, entre os quais *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.*, mostram que diversas verduras estão contaminadas com quistos ou ooquistos. As diferenças de prevalências registadas nos vários estudos devem-se provavelmente a diferentes níveis de saneamento e higiene, práticas agrícolas e métodos usados para deteção dos parasitas (Dixon, 2013).

Um dos fatores que faz com que a contaminação microbiológica destes produtos seja mais preocupante é o facto de não poderem ser submetidos a tratamentos térmicos que reduzam os perigos biológicos, ainda que seja uma responsabilidade dos operadores económicos fornecer alimentos seguros e inócuos aos consumidores (Coimbra, 2015). Outro problema relativo à contaminação microbiológica de saladas prontas a consumir é que elas podem de facto estar contaminadas e não apresentar alterações visíveis, e portanto, o consumidor não se apercebe e não as rejeita. Isto acontece porque normalmente a dose

infetante dos patógenos alimentares é inferior à quantidade necessária para degradar os alimentos (Oliveira, 2010).

Apesar de existirem vários estudos relativos à qualidade microbiológica de verduras, poucos se focam nas saladas embaladas prontas a consumir que, por definição, devem estar em condições de ser consumidas sem necessidade de lavagem, e portanto deverão estar isentas de microrganismos patogénicos que possam ser prejudiciais à saúde, como é o caso de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.*. Além disso, em Portugal este tipo de estudos é muito reduzido, tendo em conta a importância do assunto.

Deste modo, propõe-se neste trabalho pesquisar a presença destes dois protozoários em saladas embaladas prontas a consumir, visando a avaliação do risco a que os consumidores poderão estar sujeitos através do consumo deste tipo de alimentos.



# Capítulo 2

## Objetivos



## 2. Objetivos

O objetivo deste estudo foi a detecção e caracterização dos protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.* em saladas embaladas prontas a consumir, de modo a avaliar o possível risco para a segurança alimentar dos consumidores.

Com este objetivo, elaborou-se um plano de trabalho com as seguintes etapas:

- ✓ Detecção de *Giardia lamblia* em saladas prontas a consumir através das técnicas de biologia molecular nested-PCR e qPCR;
- ✓ Detecção de *Cryptosporidium sp.* em saladas prontas a consumir através das técnicas de biologia molecular nested-PCR e qPCR;
- ✓ 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 obtidas em supermercados das cidades de Coimbra e Viseu, durante o mês de outubro de 2018. As saladas analisadas foram de quatro variedades (rúcula selvagem (R), agrião (A), alface frisada (F) e salada ibérica (mistura de alface verde, alface roxa e rúcula selvagem) (I)) e de três marcas distintas (vitacress (V), chef select (C) e pingo doce (P)). As saladas das quatro variedades e das três marcas foram recolhidas em três datas distintas (1, 2 e 3), originando um total de 36 amostras (Tabela 7).

**Tabela 7.** Identificação e caracterização das amostras de saladas

<b>Amostra (código)</b>	<b>Lote</b>	<b>Data de processamento</b>	<b>Data de validade</b>	<b>Composição</b>
RVI AVI FVI IVI	L-8340 L-8540 L-8640 L-8640	09/10/2018 09/10/2018 09/10/2018 09/10/2018	11/10/2018 11/10/2018 14/10/2018 14/10/2018	Rúcula selvagem Agrião de água Alface frisada Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem (ibérica)
RCI ACI FCI ICI	284S414 810119219 284S414 284S414	15/10/2018 15/10/2018 15/10/2018 15/10/2018	17/10/2018 17/10/2018 17/10/2018 18/10/2018	Rúcula selvagem Agrião baby leaf Alface frisada Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem (ibérica)
RPI API FPI IPI	L-810129121 L-810129035 4GPD12840 282S412	16/10/2018 16/10/2018 16/10/2018 16/10/2018	19/10/2018 19/10/2018 17/10/2018 16/10/2018	Rúcula selvagem Agrião Alface frisada Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem (ibérica)
RV2 AV2 FV2 IV2	L-8642 L-8542 L-8242 L-8442	22/10/2018 22/10/2018 22/10/2018 22/10/2018	28/10/2018 25/10/2018 24/10/2018 26/10/2018	Rúcula selvagem Agrião de água Alface frisada Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem (ibérica)
RC2 AC2 FC2 IC2	292S425 810199219 291S424 292S425	23/10/2018 23/10/2018 23/10/2018 23/10/2018	25/10/2018 25/10/2018 25/10/2018 25/10/2018	Rúcula selvagem Agrião baby leaf Alface frisada Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem (ibérica)

RP2	L-810209121	24/10/2018	27/10/2018	Rúcula selvagem
AP2	L-8542	24/10/2018	25/10/2018	Agrião
FP2	4GPD12950	24/10/2018	27/10/2018	Alface frisada
IP2	L-8542	24/10/2018	25/10/2018	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem (ibérica)
RV3	L-8643	29/10/2018	03/11/2018	Rúcula selvagem
AV3	L-8643	29/10/2018	02/11/2018	Agrião de água
FV3	L-8443	29/10/2018	01/11/2018	Alface frisada
IV3	L-8643	29/10/2018	03/11/2018	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem (ibérica)
RC3	299S435	30/10/2018	01/11/2018	Rúcula selvagem
AC3	810269219	30/10/2018	01/11/2018	Agrião baby leaf
FC3	298S434	30/10/2018	01/11/2018	Alface frisada
IC3	297S433	30/10/2018	30/10/2018	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem (ibérica)
RP3	L-810259121	31/10/2018	01/11/2018	Rúcula selvagem
AP3	L-810269035	31/10/2018	02/11/2018	Agrião
FP3	4GPD13000	31/10/2018	02/11/2018	Alface frisada
IP3	299S435	31/10/2018	02/11/2018	Alface verde, alface roxa e rúcula selvagem (ibérica)

O processamento das amostras foi realizado dentro do prazo de validade das saladas e em condições de assepsia. Para cada salada, uma porção de 25 g foi colocada num *erlenmeyer* com tampa (1L), ao qual se adicionou 200 mL de solução salina estéril (0,85 % NaCl). A mistura foi agitada na incubadora vertical (*Model G25, New Brunswick Scientific Co. Inc.*) durante 15 minutos a 120 rpm. Após 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* (50 mL). Ajustou-se o volume do filtrado com solução salina e centrifugou-se a 5000 rpm 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 (1,5 mL) 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 de ADN total das amostras foi realizada com o kit comercial *NZY Tissue gDNA Isolation Kit (nzytech)*. Ao sedimento adicionou-se 0,2 g de pérolas de vidro (0,5 mm,

*BioSpec Products, Inc.*), 180 µL do tampão NT1, 20 µL de uma solução de polivinilpirrolidona (10 %) e 25 µL de proteinase K. A mistura foi agitada no vortex por 3 minutos e 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 200 µL do tampão NL, agitou-se no vortex e adicionou-se 210 µL 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 500 µL 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 600 µL 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 200 µL 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***

A amplificação do gene da subunidade menor do ARN ribossomal (*ssu rRNA*) de *Giardia lamblia* foi realizada por nested-PCR. Na primeira reação de amplificação utilizou-se o par de oligonucleotídeos *Gia2029* e *Gia2150c*, previamente descritos por Appelbee e colaboradores (2003), e na segunda reação os oligonucleotídeos *RH11* e *RH4*, descritos por Hopkins e colaboradores (1997) (Tabela 8). A primeira reação produz um fragmento de 497 pb e a segunda um fragmento de 292 pb. Ambas as reações foram realizadas para um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de *PCR Mix Plus (A&A Biotechnology)*, 1,25 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM), 1,25 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), 5 µL do ADN extraído, no caso da primeira reação, ou 1 µL do produto amplificado na primeira reação, no caso da segunda reação, e água estéril de modo a perfazer o volume final de 25 µL (Tabela 9). As amplificações foram realizadas no termociclador *Biometra Tpersonal*. Na primeira reação de amplificação utilizou-se um ciclo de desnaturação inicial a 94 °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. Na segunda reação de amplificação utilizaram-se as mesmas condições, exceto a temperatura de *annealing* que foi de 59°C. Juntamente com as amostras em estudo foram incluídos controlos positivos (ADN de *G. lamblia* WBC6), controlos negativos (água estéril) e controlos internos (ADN de salada com ADN de *G. lamblia* WBC6).

**Tabela 8.** Oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de nested-PCR para detecção de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* sp.

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência (5'- 3')	Fragmento (p.b.)	Referências
ssu rRNA	<i>Gia2029</i>	AAGTGTGGTGCAGACGGACTC	497	Appelbee et al., 2003
	<i>Gia2150c</i>	CTGCTGCCGTCCTTGGATGT		
	<i>RH11</i>	CATCCGGTCGATCCTGCC	292	Hopkins et al., 1997
	<i>RH4</i>	AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG		
ssu rRNA	<i>Crypto18SF1</i>	TTCTAGAGCTAATACATGCG	1325	Xiao et al., 1999
	<i>Crypto18SR1</i>	CCCTAATCCTTCGAAACAGGA		
	<i>Crypto18SF2</i>	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAA	825	
	<i>Crypto18SR2</i>	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA		

**Tabela 9.** Composição da mistura utilizada na reação de nested-PCR para detecção de *Giardia lamblia*

Reagentes	Quantidade (µL)	
	1ª reação	2ª reação
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.

A amplificação do gene da subunidade menor 18S do RNA ribossomal (*ssu rRNA*) de *Cryptosporidium* sp. foi realizada por nested-PCR. Na primeira reação de amplificação utilizou-se o par de oligonucleotídeos *Crypto 18SF1* e *Crypto 18SR1* e na segunda reação os

oligonucleotídeos *Crypto 18SF2* e *Crypto 18SR2*, previamente descritos por Xiao e colaboradores (1999) (Tabela 8). A primeira reação produz um fragmento de 1325 pb e a segunda um fragmento de 825 pb. Ambas as reações foram realizadas para um volume final de 25  $\mu$ L, contendo 12,5  $\mu$ L de *PCR Mix Plus* (A&A Biotechnology), 1,25  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo (10  $\mu$ M), 3  $\mu$ L de albumina de soro bovino (BSA) (2 mg/ml), 5  $\mu$ L do ADN extraído no caso da primeira reação, ou 1  $\mu$ L do produto amplificado na primeira reação no caso da segunda reação, e água estéril de modo a perfazer o volume final (Tabela 10). As amplificações foram realizadas no termociclador *BioRad MJ Mini*. Para ambas as reações 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, 55 °C durante 45 segundos e 72 °C durante 60 segundos; e um ciclo final a 72 °C durante 7 minutos. Juntamente com as amostras em estudo foram incluídos controlos positivos (ADN de *Cryptosporidium sp.*), controlos negativos (água estéril) e controlos internos (ADN de salada com ADN de *Cryptosporidium sp.*).

**Tabela 10.** Composição da mistura utilizada na reação de nested-PCR para deteção de *Cryptosporidium sp.*

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

### 3.4. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

#### 3.4.1. *Giardia lamblia*

As amostras onde ocorreu amplificação do gene *ssu rRNA* por nested-PCR foram analisadas por PCR quantitativo em tempo real, utilizando o gene *triosephosphate isomerase (tpi)* de *Giardia lamblia*, de modo a detetar e genotipar os isolados. O fragmento específico do

genótipo A é de 77 pb, apresenta um *melting peak* de 86 °C, e foram utilizados os oligonucleótidos *tpiA\_F* e *tpiA\_R*, previamente descritos por Almeida e colaboradores (2010). O fragmento específico do genótipo B é de 77 pb, apresenta um *melting peak* de 80 °C, e utilizaram-se os oligonucleótidos *tpiB\_F* e *tpiB\_R*, descritos por Almeida e colaboradores (2010) (Tabela 11).

As reações foram realizadas para um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de *RT HS-PCR Mix Eva Green* (A&A Biotechnology), 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM), 1 µL do ADN extraído e 9,5 µL de água estéril (Tabela 12). As amplificações foram realizadas no termociclador *CFX96 Real-Time System C1000* (Bio-Rad Laboratories) e a análise dos resultados foi feita através do programa *Bio-Rad CFX Manager* (Bio-Rad Laboratories). Na reação de amplificação utilizou-se um ciclo de desnaturação inicial a 98 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação a 59 °C durante 5 segundos. No final de cada reação houve um aumento de temperatura de 5 °C a cada 5 segundos até atingir os 95 °C, obtendo-se um sinal de fluorescência por cada um dos aumentos, de modo a obter a curva de *melting*.

As reações de amplificação foram realizadas em duplicado e juntamente com as amostras em estudo foram incluídos controlos positivos (ADN de *G. lamblia* genótipo A (WBC6); ADN de *Giardia lamblia* genótipo B), controlos negativos (água estéril) e controlos internos (ADN de salada com ADN de *G. lamblia* genótipo A (WBC6); ADN de salada com ADN de *G. lamblia* genótipo B).

### **3.4.2. *Cryptosporidium* sp.**

A amplificação do gene *18S rDNA* de *Cryptosporidium* sp. foi realizada por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Para amplificação do fragmento de 315 pb do gene *18S rDNA*, que apresenta um *melting peak* de 82 °C, foram utilizados os oligonucleótidos *Crypto F* e *Crypto R*, anteriormente descritos por Lalonde e Gajadhar (2011) (Tabela 11).

As reações foram realizadas para um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de *RT HS-PCR Mix Eva Green* (A&A Biotechnology), 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM), 2 µL do ADN extraído, e 8,5 µL de água estéril (Tabela 12). As amplificações foram realizadas no termociclador *CFX96 Real-Time System C1000* (Bio-Rad Laboratories) e a análise dos resultados foi feita através do programa *Bio-Rad CFX Manager* (Bio-Rad Laboratories). Na reação de amplificação utilizou-se um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação a 55 °C durante 30 segundos. No final de cada reação houve um aumento de temperatura de 5 °C a cada 5 segundos até atingir os 95 °C, obtendo-se um sinal de fluorescência por cada um dos aumentos, de modo a obter a curva de *melting*.

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

**Tabela II.** Oligonucleotídeos sintéticos utilizados na reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para detecção de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.*

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência (5'- 3')	Fragmento (p.b.)	Melting peak (°C)	Referências
Tpi	tpiA_F	TCGTCATTGCCCTTC CGCC	77	86	Almeida et al., 2010
	tpiA_R	CGCTGCTATCCTCA ACTG			
	tpiB_F	GATGAACGCAAGGCC AATAA	77	80	
	tpiB_R	GATTCTCCAATCTC CTTCTT			
18S rDNA	Crypto F	AGTGACAAGAAATAAC AATACAGG	315	82	Lalonde e Gajadhar, 2011
	Crypto R	CCTGCTTTAAGCACTC TAATTTTC			

**Tabela 12.** Composição da mistura utilizada na reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para detecção de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.*

Reagentes	Quantidade (µL)	
	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Cryptosporidium sp.</i>
RT HS-PCR Mix Eva Green (A&A Biotechnology)	12,5	12,5
Oligonucleotídeo senso	1	1
Oligonucleotídeo antisenso	1	1
Água estéril	9,5	8,5
ADN (amostra)	1	2
Volume final	25	25

### 3.5. Visualização dos fragmentos de ADN amplificados no nested-PCR

Os fragmentos amplificados no nested-PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose. No caso da visualização dos amplicões de *Giardia lamblia*, preparou-se o gel de agarose a 2 %, contendo 0,8 g de agarose, 40 mL do tampão Tris ácido bórico e EDTA (TBE) (1 %) e 2 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Para os amplicões de *Cryptosporidium sp.* preparou-se o gel de agarose a 1 %, diferindo apenas na quantidade de agarose, que foi de 0,4 g. Em cada poço do gel colocou-se 15 µL dos produtos amplificados. Utilizou-se o marcador de massa molecular *NzyDNA Ladder VI* (*Nzytech*) para comprovação do tamanho dos fragmentos amplificados. A migração foi realizada a 100 V durante 90 minutos em tampão de corrida TBE (0,5 %). No final o gel foi visualizado e fotografado sobre luz ultravioleta no transiluminador *Vilbert Lourmat*.

### 3.6. Sequenciação

Nas amostras em que ocorreu amplificação do gene *ssu rRNA* por nested-PCR, os produtos da reação foram purificados utilizando o kit *GeneJET PCR Purification Kit* (*Thermo Scientific*). Adicionou-se ao produto de PCR a mesma quantidade de *Binding buffer*, transferiu-se para uma coluna colocada num tubo coletor e centrifugou-se a 12.000 x g durante 1 minuto. Depois de descartar o conteúdo do tubo coletor, adicionou-se 700 µL de *Wash buffer* e centrifugou-se novamente a 12.000 x g durante 1 minuto. Descartou-se novamente o conteúdo do tubo coletor e centrifugou-se mais uma vez a 12.000 x g durante 1 minuto. O tubo coletor foi substituído por um tubo de microcentrifuga devidamente identificado, adicionou-se à coluna 30 µL de água estéril e centrifugou-se a 12.000 x g durante 1 minuto. Os tubos contendo o ADN purificado foram armazenados a -20 °C.

O ADN purificado foi quantificado utilizando o *Nano Drop ND-1000*.

As cadeias de ADN foram sequenciadas em ambos os sentidos pelo método dos terminadores de cadeia automatizado.

As sequências nucleotídicas obtidas para cada amostra foram analisadas através do programa *BioEdit* e alinhadas com recurso ao programa *MEGA* versão 6.

Utilizou-se o programa *BLAST* para comparar as sequências obtidas com as sequências disponíveis no *GenBank*.

# Capítulo 4

## Resultados



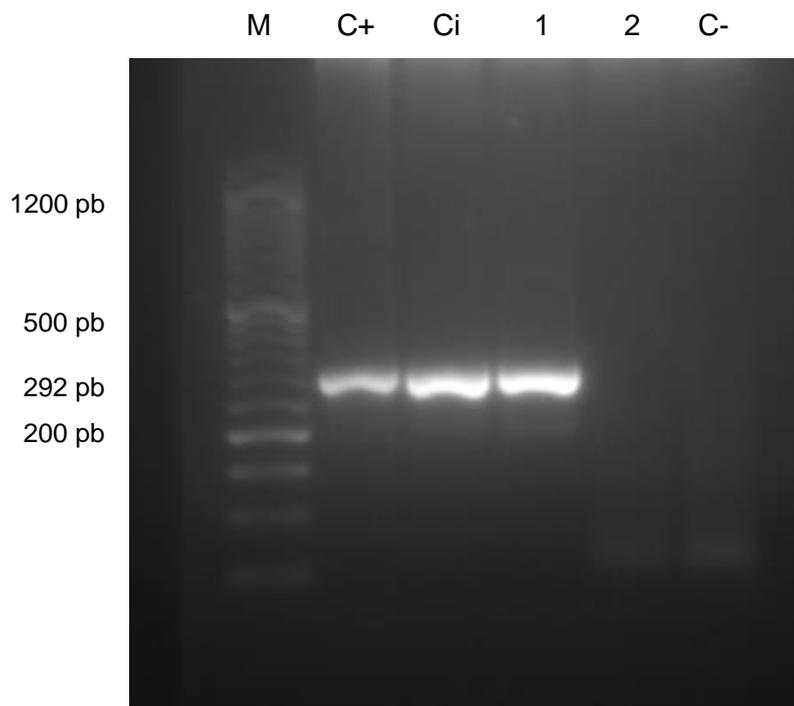
## 4. Resultados

### 4.1. Deteção de *Giardia lamblia*

#### 4.1.1. Nested-PCR

O nested-PCR amplificou fragmentos de 292 pb do gene *ssu rRNA* de *Giardia lamblia* em 17 das 36 amostras de saladas analisadas (47,22 %) (RV1, FV1, IV1, API, RV2, AV2, IV2, AP2, FP2, FV3, RC3, FC3, IC3, RP3, AP3, FP3, IP3) (Tabela 13). Houve ainda amplificação nas amostras controlo positivo e controlo interno. Na figura 3 encontram-se resultados exemplificativos de algumas das amostras analisadas. A marca chef select (C) foi a que revelou um menor índice de contaminação, com 3 amostras positivas, constituindo 8,33 % do total de amostras (36 saladas) e 17,65 % do total de amostras positivas (17 saladas), enquanto que as marcas vitacress (V) e pingo doce (P) apresentaram ambas 7 amostras positivas, constituindo 19,44 % do total de amostras e 41,18 % do total de amostras positivas.

Relativamente às diferentes variedades de saladas, observaram-se 4 amostras positivas de rúcula, de agrião e de salada ibérica, constituindo 11,11 % do total de amostras e 23,53 % das amostras positivas, e 5 de alface frisada, que corresponde a 13,89 % das amostras positivas e 29,41 % das amostras positivas, não havendo diferenças significativas.



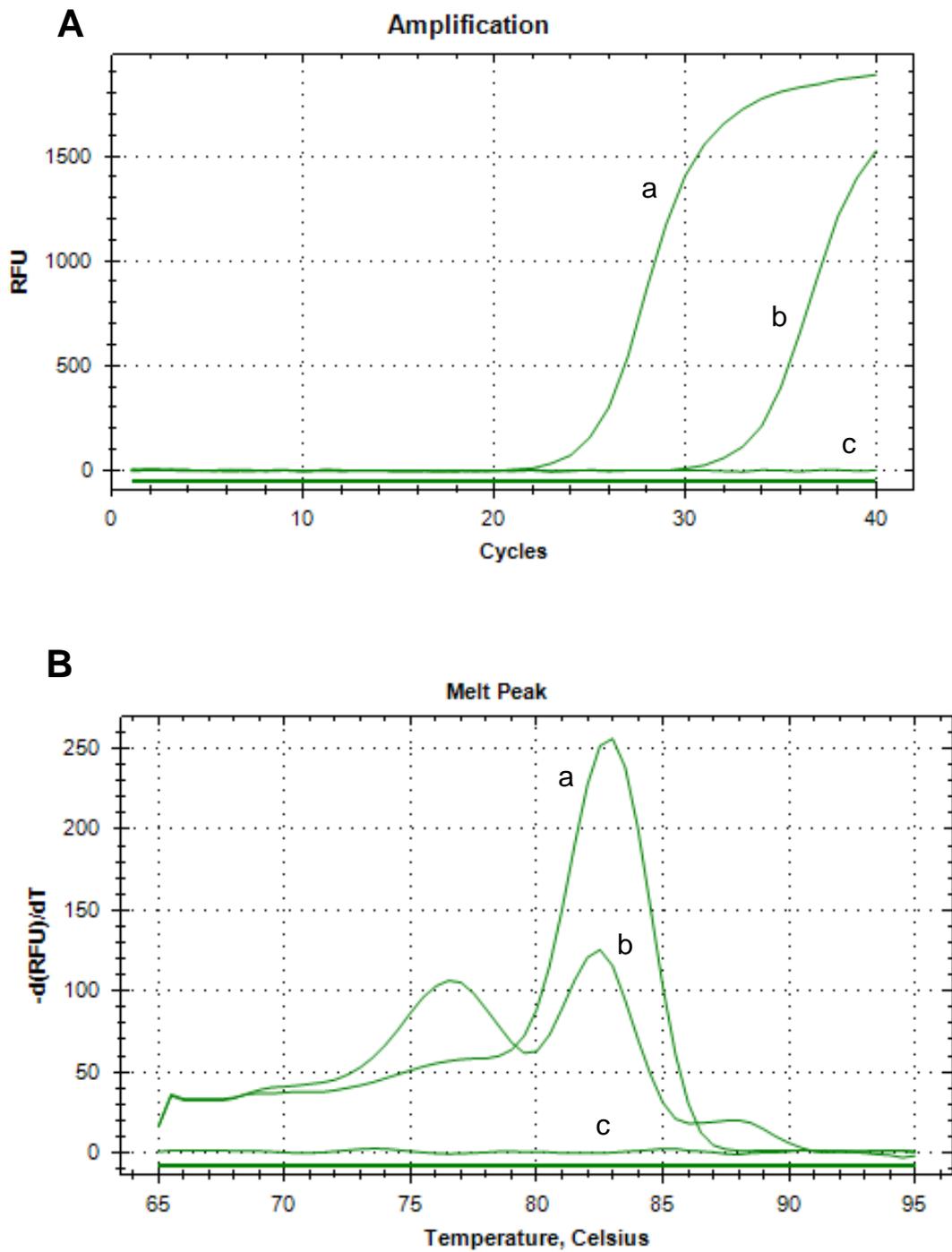
**Figura 3.** Separação eletroforética em gel de agarose 2 % e coloração com brometo de etídio dos produtos do nested-PCR do gene *ssu rRNA* de *Giardia lamblia* (M: marcador de massa molecular NzyDNA Ladder VI (Nzytech); C+: controlo positivo; Ci: controlo interno; 1: amostra RV2 (positiva); 2: amostra FCI (negativa); C-: controlo negativo).

**Tabela 13.** Deteção de *Giardia lamblia* por qPCR e nested-PCR

Amostras	Nested-PCR	qPCR (gene <i>tpi</i> )		
		Genótipo A	Genótipo B	
Controlo positivo	genótipo A	+	+	n.a.
	genótipo B	+	n.a.	+
Controlo interno	genótipo A	+	+	n.a.
	genótipo B	+	n.a.	+
Controlo negativo	-	-	-	-
RV1, RV2, IP3	+	+	+	-
FV1, AV2, IV2	+	-	-	+
FP2	+	+	+	+
IV1, API, AP2, FV3, RC3, FC3, IC3, RP3, AP3, FP3	+	-	-	-
AV1, RCI, ACI, FCI, ICI, RPI, FPI, IPI, FV2, RC2, AC2, FC2, IC2, RP2, IP2, RV3, AV3, IV3, AC3	-	n.a.	n.a.	n.a.

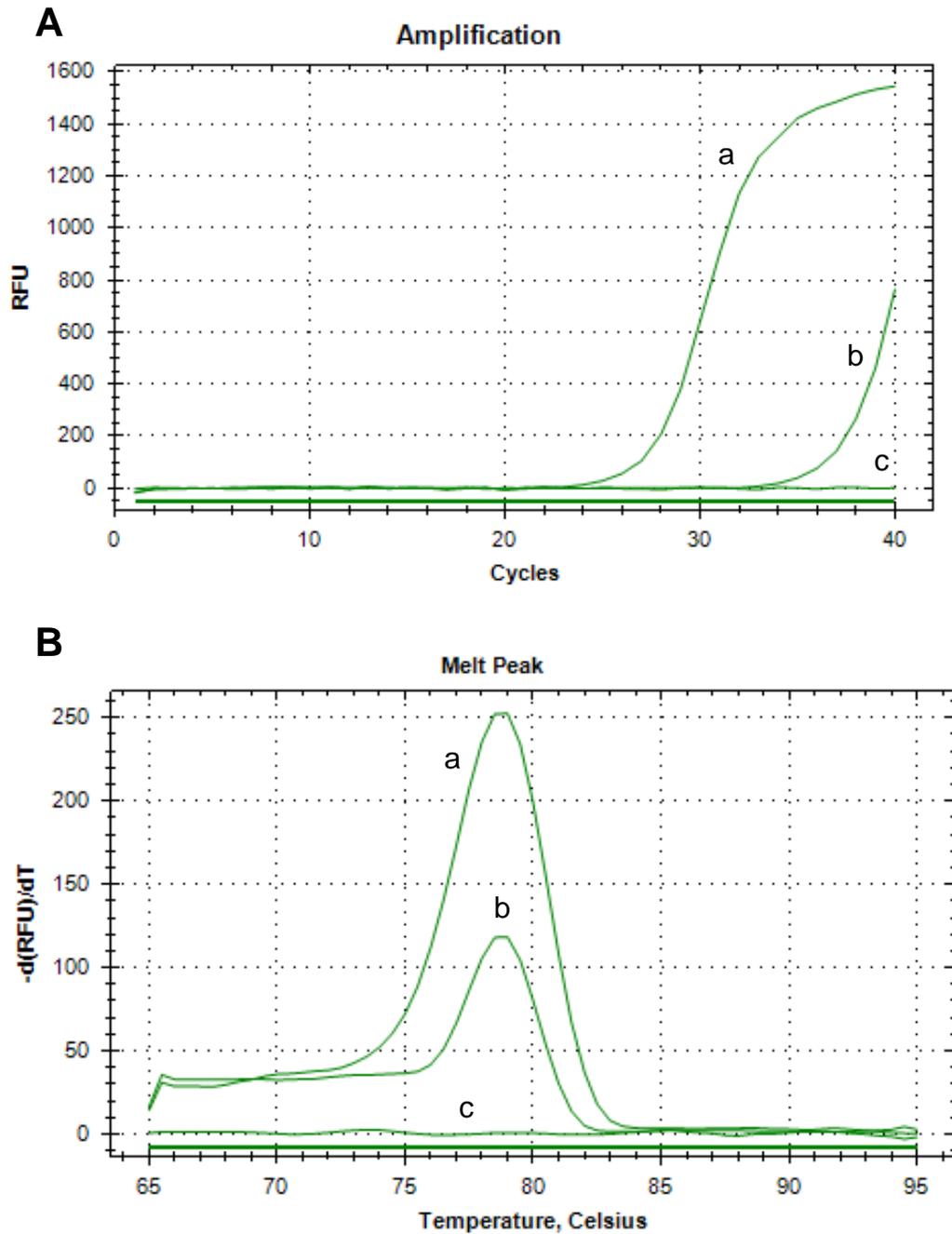
#### 4.1.2. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Nas amostras em que ocorreu amplificação do gene *ssu rRNA* de *Giardia lamblia* por nested-PCR foi realizado o qPCR para os genótipos A e B, ambos responsáveis pela infeção no Homem, permitindo fazer a genotipagem (Almeida *et al.*, 2010). No caso do qPCR do gene *tpi* específico do genótipo A ocorreu amplificação nas amostras controlo positivo e controlo interno, bem como em 4 das 17 amostras analisadas (RV1, RV2, FP2 e IP3) (Ct entre 32 e 36) (Figura 4A). Contudo, o *melting peak* não foi de 86 °C mas sim de 83 °C (Figura 4B).



**Figura 4.** Curvas de amplificação (A) e de *melt*ing (B) do qPCR do gene *tpi* do genótipo A (WBC6) de *Giardia lamblia*. a) controlo positivo, b) amostra RVI (positiva), c) controlo negativo.

No caso do qPCR do gene *tpi* específico do genótipo B ocorreu amplificação nas amostras controlo positivo e controlo interno e em 4 das 17 amostras analisadas (FV1, AV2, IV2 e FP2) (Ct entre 32 e 36) (Figura 5A). Contudo, o *melting peak* não foi de 80 °C mas sim de 79 °C (Figura 5B).

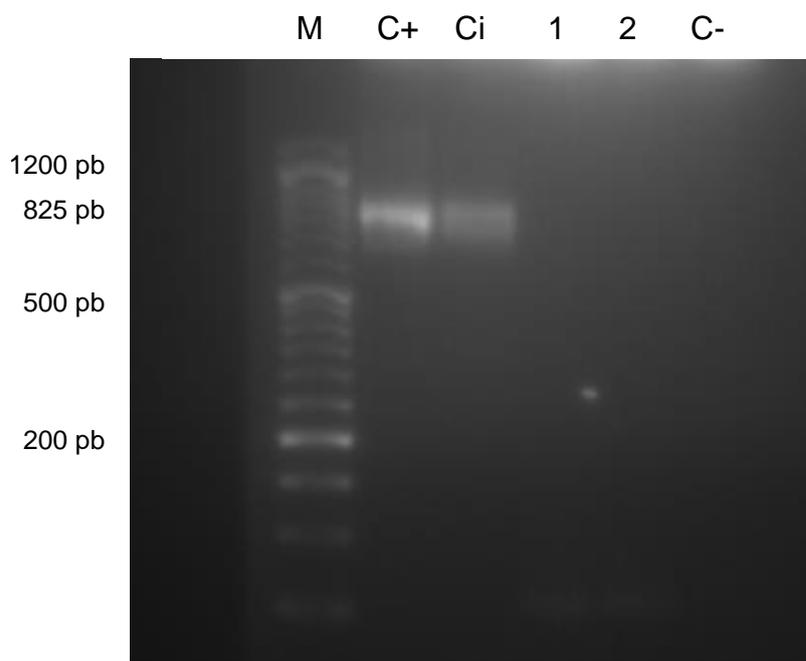


**Figura 5.** Curvas de amplificação (A) e de *melting* (B) do qPCR do gene *tpi* do genótipo B de *Giardia lamblia*. a) controlo positivo, b) amostra AV2 (positiva), c) controlo negativo.

## 4.2. Deteção de *Cryptosporidium* sp.

### 4.2.1. Nested-PCR

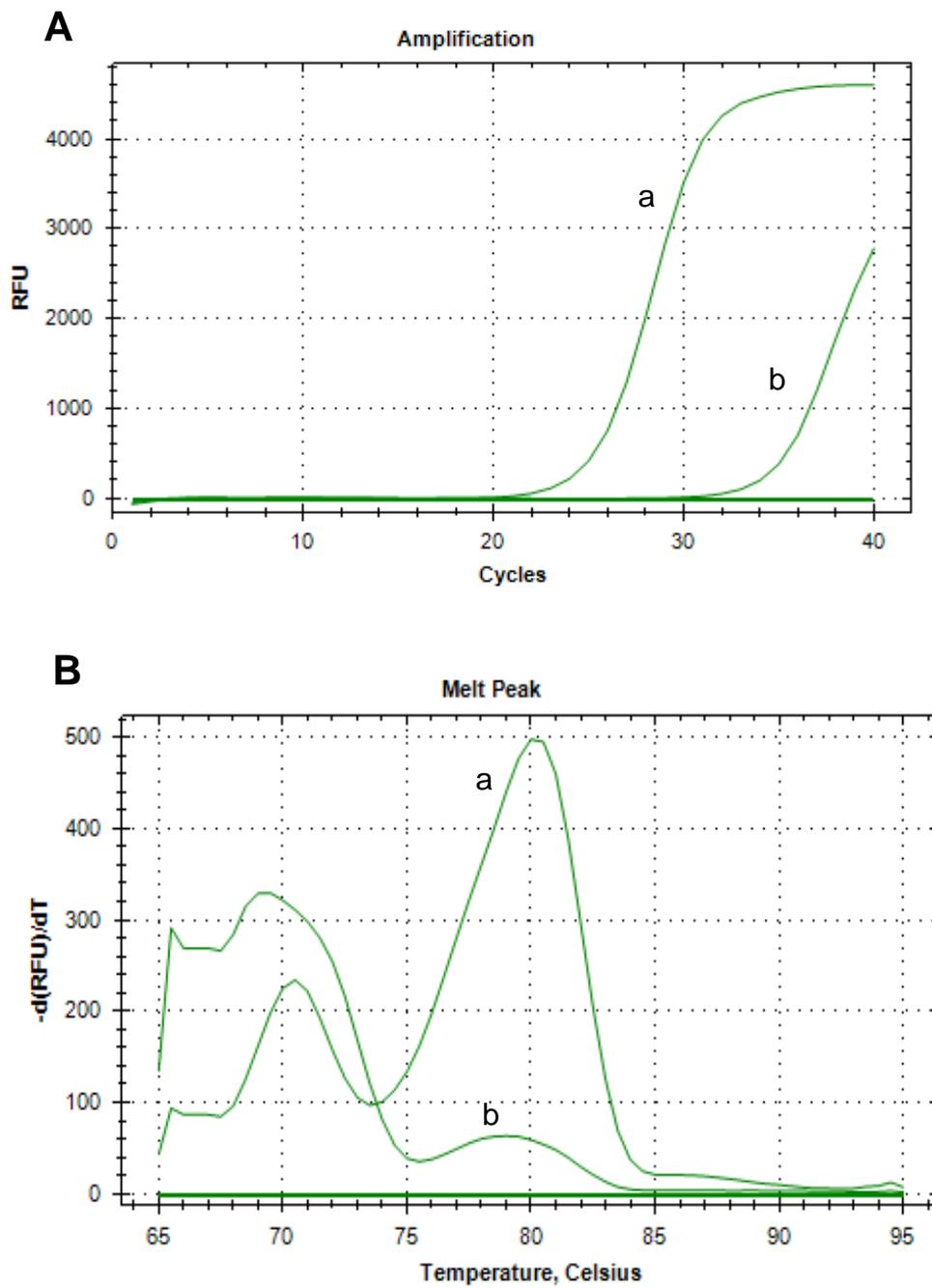
O nested-PCR amplificou fragmentos de 825 pb do gene *ssu rRNA* de *Cryptosporidium* sp. apenas nas amostras controlo positivo e controlo interno, não havendo amplificação em nenhuma das 36 amostras de saladas analisadas. Na figura 8 encontram-se resultados exemplificativos de algumas das amostras analisadas.



**Figura 6.** Separação eletroforética em gel de agarose 1 % 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; Ci: controlo interno; 1: amostra RVI (negativa); 2: amostra AP3 (negativa); C-: controlo negativo).

### 4.2.2. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O qPCR amplificou fragmentos de ADN do gene *18S rDNA* de *Cryptosporidium* sp. apenas nas amostras controlo positivo e controlo interno, não havendo amplificação em nenhuma das 36 amostras de saladas analisadas (Figura 7A). Contudo, o *melting peak* foi de 80 °C e não de 82 °C (Figura 7B).



**Figura 7.** Curva de amplificação (A) e de *melting* (B) do qPCR do gene *18S rDNA* de *Cryptosporidium* sp.. a) controlo positivo, b) controlo negativo.

### 4.3. Identificação de espécies/genótipos de *Giardia* por sequenciação

As 17 amostras positivas no nested-PCR do gene *ssu rRNA* de *Giardia lamblia* foram sujeitas a purificação e sequenciação dos produtos da reação. Em 11 dessas amostras (RV1, RV2, RP3, AV2, AP2, AP3, FV3, FC3, FP2, IC3 e IP3) o alinhamento das sequências (senso e anti-senso) do fragmento de 292 pb mostrou 100 % de homologia com as sequências de referência de *Giardia lamblia* (M54878, MK990738, etc.) (Tabela 14). A figura 11 mostra o alinhamento múltiplo de fragmentos das sequências do gene *ssu rRNA* de *Giardia lamblia* da estirpe referência M54878 e de uma amostra exemplificativa (FP2).

**Tabela 14.** Homologia das sequências do gene *ssu rRNA* de *Giardia* das amostras em estudo com as disponíveis no *GenBank*

Amostras	Homologia
RV1	100 % <i>Giardia lamblia</i> (M54878, MK990738, etc.)
RV2	
RP3	
AV2	
AP2	
AP3	
FV3	
FC3	
FP2	
IC3	
IP3	

Sequences producing significant alignments:  
 Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> G.lamblia small subunit ribosomal (16S-like) RNA	418	418	100%	3e-121	100.00%	<a href="#">M54878.1</a>

Download GenBank Graphics

**G.lamblia small subunit ribosomal (16S-like) RNA**  
 Sequence ID: [M54878.1](#) Length: 1453 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 227 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
418 bits(226)	3e-121	226/226(100%)	0/226(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  ATCCGGTCGATCCTGCCGGAGCGCGACGCTCTCCCAAGGACGAAGCCATGCATGCCCGC 60
          |||
Sbjct 2  ATCCGGTCGATCCTGCCGGAGCGCGACGCTCTCCCAAGGACGAAGCCATGCATGCCCGC 61

Query 61  TCACCCGGGACGCGGGCGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGGGCGGTCCCTGC 120
          |||
Sbjct 62  TCACCCGGGACGCGGGCGGACGGCTCAGGACAACGGTTGCACCCCCCGGGCGGTCCCTGC 121

Query 121 TAGCCGGACACCGCTGGCAACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGGGCGGGCGCCCGCGG 180
          |||
Sbjct 122 TAGCCGGACACCGCTGGCAACCCGGCGCCAAGACGTGCGCGCAAGGGCGGGCGCCCGCGG 181

Query 181  GCGAGCAGCGTGACGCGAGCGACGGCCCGCCGGGCTTCCGGGGCAT 226
          |||
Sbjct 182  GCGAGCAGCGTGACGCGAGCGACGGCCCGCCGGGCTTCCGGGGCAT 227
  
```

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate ET265 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">MK990738.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate H14 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KY658188.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate Tabuk 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KT84470.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate 176 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KY012354.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate S19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KX384156.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate S14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KX384155.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate S10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KX384154.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate S6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KX384153.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate S5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KX384152.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate G14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KX384151.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate G12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KX384150.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate G7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KX384149.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate G6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KX384148.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis isolate G2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KX384147.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Giardia intestinalis genotype Assemblage A small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	418	418	100%	4e-113	100.00%	<a href="#">KJ867494.1</a>

**Figura 8.** Alinhamento múltiplo de fragmentos das seqüências do gene *ssu rRNA* de *Giardia lamblia* da estirpe referência M54878 e da amostra FP2. O programa *BLAST* foi utilizado para comparar as seqüências nucleotídicas disponíveis no *GenBank*.

Os genótipos de *Giardia lamblia* (A-G) distinguem-se pela composição de nucleotídeos nas posições 22, 23, 24, 38, 44, 45, 63, 73 e 93 do gene *ssu rRNA* (Tabela 15).

**Tabela 15.** Diferenciação dos genótipos de *Giardia lamblia* com base nas posições nucleotídicas do gene *ssu rRNA*

Genótipo ( <i>assemblage</i> )	Posição nucleotídica								
	22	23	24	38	44	45	63	73	93
<b>A</b>	G	C	G	A	G	-	T	C	A
<b>B</b>	A	T	C	A	A	C	G	G	A
<b>C</b>	A	T	C	A	A	C	A	G	A
<b>D</b>	A	T	C	A	A	C	A	A	A
<b>E</b>	G	C	G	A	G	-	T	C	G
<b>F</b>	G	C	G	C	G	-	T	C	A
<b>G</b>	A	T	C	A	G	-	A/G	G	A

Sequências de referência:

**A:** M54878, AF199446; **B:** AF199447, AF113898; **C:** AF113899, AY775200; **D:** AF113900, AY775199; **E:** AF113902, AF199448, AY 297957; **F:** AF113901, AF199444, DQ836339; **G:** AF199450, AF113896.

Com base nas posições nucleotídicas, as 11 amostras sequenciadas foram todas identificadas como genótipo A (Tabela 16).

**Tabela 16.** Genotipagem de *Giardia lamblia* com base nas posições nucleotídicas do gene *ssu rRNA*

Amostra	Posição nucleotídica									Genótipo
	22	23	24	38	44	45	63	73	93	
<b>RV1</b>	G	C	G	A	G	-	T	C	A	A
<b>RV2</b>	G	C	G	A	G	-	T	C	A	A
<b>RP3</b>	G	C	G	A	G	-	T	C	A	A
<b>AV2</b>	G	C	G	A	G	-	T	C	A	A
<b>AP2</b>	G	C	G	A	G	-	T	C	A	A
<b>AP3</b>	G	C	G	A	G	-	T	C	A	A
<b>FV3</b>	G	C	G	A	G	-	T	C	A	A
<b>FC3</b>	G	C	G	A	G	-	T	C	A	A
<b>FP2</b>	G	C	G	A	G	-	T	C	A	A
<b>IC3</b>	G	C	G	A	G	-	T	C	A	A
<b>IP3</b>	G	C	G	A	G	-	T	C	A	A

# Capítulo 5

## Discussão



## 5. Discussão

Os protozoários intestinais *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.* têm vindo a ser cada vez mais estudados devido à sua capacidade de causar doenças diarreicas agudas e crónicas, mais frequentemente em crianças, idosos e imunocomprometidos, que são considerados grupos de risco (Carvalho, 2009). Representam um problema de grande impacto na saúde pública, agravado pela ocorrência de surtos causados pela ingestão de água ou alimentos contaminados por estes protozoários (Carvalho, 2009).

As saladas prontas a consumir são conhecidas como refeições de risco, propensas a diferentes tipos de contaminação microbiológica, podendo por vezes levar a surtos alimentares (Yamoudy *et al.*, 2015).

Neste estudo foram aplicadas técnicas de biologia molecular, entre elas nested-PCR, PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e sequenciação, com o objetivo de detetar e caracterizar os protozoários *G. lamblia* e *Cryptosporidium sp.* em saladas embaladas prontas a consumir, de modo a avaliar o risco para a saúde dos consumidores associado a este tipo de alimentos.

Observou-se amplificação do gene *ssu rRNA* de *G. lamblia* por nested-PCR em 17 das 36 amostras de saladas analisadas (47,22 %) e amplificação do gene *tpi* de *Giardia lamblia* por qPCR em 7 dessas amostras positivas. Entre estas 7 amostras amplificadas por qPCR, quatro amplificaram no qPCR específico do genótipo A e quatro no específico do genótipo B, sendo que uma delas (FP2) amplificou em ambos os qPCR (A e B). O facto de algumas amostras terem amplificado por nested-PCR mas não por qPCR, apesar desta técnica ter maior sensibilidade, deve-se provavelmente à natureza multicópia do gene *ssu rRNA*, enquanto que o gene *tpi* é de cópia simples. As amostras onde ocorreu amplificação do gene *ssu rRNA* por nested-PCR foram sujeitas a sequenciação, identificando-se o genótipo A de *G. lamblia* em 11 amostras (30,56 %). Adicionalmente, os resultados da sequenciação das amostras AV2 e FP2 (genótipo A) não foram concordantes com os obtidos no qPCR do gene *tpi* (genótipo B).

A amplificação simultânea dos genótipos A e B na amostra FP2 bem como a inconsistência na genotipagem nas amostras AV2 e FP2 podem representar infeções mistas ou recombinação. Na primeira situação, os dois genótipos podem ser responsáveis pela infeção no mesmo hospedeiro e a sua deteção depende da proporção relativa, podendo ocorrer amplificação preferencial de um dos genótipos. Na recombinação genética, trocas genéticas dentro ou entre genótipos podem criar recombinantes, contendo sequências específicas de genótipo A num genoma de genótipo B e vice-versa (Broglia *et al.*, 2013). A elevada frequência de infeções mistas e este tipo de inconsistências tem vindo a ser reportado em vários estudos

tanto no Homem como em animais (Broglia *et al.*, 2013, Caccio *et al.*, 2005 e Sprong *et al.*, 2009).

Quanto à deteção de *Cryptosporidium sp.*, não ocorreu amplificação em nenhuma das 36 amostras analisadas pelas técnicas de nested-PCR e qPCR.

Em todos os controlos negativos realizados não foi detetada qualquer positividade, do mesmo modo que todos os controlos positivos tiveram um resultado positivo nos testes, garantindo assim a especificidade de cada um dos testes realizados. Foram ainda realizados controlos internos para cada uma das amostras, isto é, a contaminação propositada das amostras em teste com ADN dos quistos ou ooquistos dos parasitas, de modo a garantir que as amostras não continham nenhum tipo de inibidor que impossibilitasse a amplificação específica do ADN dos parasitas. Todos os controlos internos se revelaram positivos, validando assim os resultados obtidos em todas as amostras.

Contudo, nas amostras em que não ocorreu amplificação de ADN dos protozoários através dos métodos utilizados, não significa necessariamente que estes não estejam presentes. Em primeiro lugar, pode dever-se ao facto dos quistos e ooquistos dos parasitas estarem presentes nas amostras em quantidades inferiores ao limite de deteção dos métodos utilizados, que deste modo não teriam a capacidade de os detetar e portanto as amostras seriam classificadas como negativas. Um outro fator que pode condicionar a deteção é a taxa de recuperação das estruturas parasitárias durante o processamento das saladas, uma vez que parte dos quistos e ooquistos perdem-se durante esta fase. A percentagem de recuperação de quistos de *Giardia* e ooquistos de *Cryptosporidium* pode variar entre 10 e 100%, em consequência das diferentes técnicas aplicadas, bem como da variabilidade das amostras (Carvalho, 2009). Segundo Pereira (2008) a percentagem de recuperação de quistos/ooquistos também é influenciada pela quantidade da amostra e pelo tempo de agitação durante a lavagem. As melhores percentagens de recuperação verificam-se quando a quantidade é menor, provavelmente devido à redução dos resíduos interferentes, no entanto deve ser utilizada uma quantidade de amostra suficiente para detetar baixos níveis de contaminação (Pereira, 2008). O tipo de vegetal e a solução utilizada no processamento também influenciam a percentagem de recuperação, que é sempre inferior a 100% (Shields *et al.*, 2012). Além disso, também a eficácia da rutura dos quistos e ooquistos durante a extração de ADN poderão condicionar a sua deteção, visto que caso não tenha ocorrido uma rutura eficiente, o ADN não será libertado e, consequentemente, não poderá ser detetado através dos métodos utilizados (Carvalho, 2009).

A presença de qualquer número de quistos de *Giardia* ou ooquistos de *Cryptosporidium* em produtos frescos, é indicativo de contaminação fecal e pode representar um problema do

ponto de vista da segurança alimentar (Dixon *et al.*, 2013). Apesar de neste trabalho ter sido feita apenas a detecção, e não a quantificação e viabilidade dos quistos, a presença de ADN de *Giardia* já demonstra que as saladas foram sujeitas a contaminação fecal, o que pode representar um risco para a saúde dos consumidores.

A detecção de *G. lamblia* genótipos A e B nas amostras analisadas deve ser considerado preocupante, porque estes genótipos são responsáveis pela infeção no Homem. Ainda que ocorram infeções assintomáticas, em muitos casos a infeção caracteriza-se pela ocorrência de diarreia, perda de peso, náuseas, desconforto e distensão abdominal e flatulência. Geralmente a infeção é auto-limitada, terminando após duas a quatro semanas, no entanto, a diarreia pode tornar-se persistente e crónica, levando a um atraso de crescimento em crianças devido à má absorção intestinal (Pedroso e Amarante, 2006). A giardíase tem um grande impacto a nível de saúde pública devido à sua elevada prevalência ter origem em grandes surtos hídricos e alimentares, e aos efeitos que pode ter sobre o crescimento e funções cognitivas das crianças infetadas (Feng e Xiao, 2011).

Tendo em conta que a dose infetante em humanos varia entre 10 a 100 quistos (Almeida *et al.*, 2010) e que o limite de detecção foi de 1 trofozoíto no qPCR (Almeida *et al.*, 2010) e de 30,5 ng/mL (10 quistos) no nested-PCR (Pereira, 2016), as amostras positivas poderão representar um risco para a saúde dos consumidores. Além disso, deve-se ter em conta que a percentagem de recuperação é sempre inferior a 100% e que existem grupos de risco para os quais a dose infetante é menor.

Vários estudos têm sido realizados para avaliar os níveis de contaminação microbiológica em vegetais. Em Portugal, Pereira (2016) analisou 24 amostras de saladas, tendo só detetado *Giardia lamblia*, genótipo A, em uma delas (4,17 %). Pina (2017) pesquisou *Giardia* e *Cryptosporidium* em 80 amostras de vegetais consumidos crus, no entanto todas se revelaram negativas. No Brasil, a análise de hortaliças detetou *Giardia lamblia* em amostras de alface (6,6 %) e em amostras de rúcula (1,6 %), não tendo sido detetado *Cryptosporidium* sp. (Pereira, 2008). Silva e colaboradores (2005) pesquisaram protozoários em 100 amostras de hortaliças, detetando positividade na alface (60 %) e agrião (30 %), sendo *Cryptosporidium* sp. o protozoário mais frequentemente encontrado.

Alguns estudos relatam diferenças na contaminação por enteroparasitas consoante o tipo de hortaliça e a sua estrutura física, sendo mais frequentes em hortaliças de folha mais lisa, como a alface lisa e a rúcula, que se deve provavelmente a um maior contacto com o solo durante o cultivo. Por outro lado, as hortaliças de folha mais rugosa, como a alface frisada, possuem uma estrutura mais fechada e firme, dificultando o contacto com o solo (Silva *et al.*, 2005 e Pereira, 2008). No presente estudo não foram observadas essas diferenças, uma vez

que as amostras positivas a *G. lamblia* se distribuem de forma semelhante entre as quatro variedades utilizadas (rúcula, agrião, alface frisada e salada ibérica). Contudo, é necessário ter em conta que o número de amostras por cada variedade foi pequeno (9 amostras de cada variedade) e que os vegetais não foram analisados na altura da colheita.

Entre as três marcas analisadas, chef select (C) foi a que revelou um menor índice de contaminação, com 3 amostras positivas, constituindo 8,33 % do total de amostras (36 saladas) e 17,65 % do total de amostras positivas (17 saladas). As marcas vitacress (V) e pingo doce (P) apresentaram ambas 7 amostras positivas, constituindo 19,44 % do total de amostras e 41,18 % do total de amostras positivas. No entanto, embora possa ser revelador as diferenças encontradas entre as marcas, deve-se ter em conta que o número de amostras é relativamente reduzido.

A contaminação dos alimentos, neste caso das saladas, pode ocorrer de diversas formas, nomeadamente devido à utilização de águas contaminadas para irrigação, mistura em pesticidas ou lavagem dos produtos, devido aos animais que poderão contaminar as culturas quer por acesso direto, quer por utilização do seu estrume, ou ainda devido à falta de higiene dos manipuladores durante as fases de colheita, armazenamento, transporte, embalagem ou preparação (Dixon *et al.*, 2013).

Os quistos de *G. lamblia* e ooquistos de *Cryptosporidium sp.* são resistentes à cloração, principalmente os ooquistos, e não se conhece bem a eficiência da desinfeção na inativação dos quistos e ooquistos (Heller *et al.*, 2004). Os processos convencionais de tratamento de água não são muito eficazes contra estes parasitas, permitindo que os quistos e ooquistos permaneçam viáveis no ambiente durante muito tempo (Fregonesi *et al.*, 2012). Estes fatores fazem com que a presença destes parasitas ao longo da cadeia alimentar seja ainda mais preocupante, visto que a sua remoção apresenta algumas dificuldades.

Assim, é importante a adoção de medidas preventivas de modo a controlar ou, pelo menos, minimizar este problema. Segundo Dixon e colaboradores (2013) são necessários estudos para determinar as taxas de sobrevivência de quistos e ooquistos destes parasitas em alimentos sujeitos a diferentes condições ambientais de modo a desenvolver formas de minimizar a sua contaminação. Esta informação seria útil no desenvolvimento de avaliações de risco e de sistemas de HACCP, assim como ao nível da gestão de risco e da tomada de decisões políticas. Ao nível da produção, o controlo deve incluir a monitorização da qualidade da água utilizada para irrigação, a restrição do acesso de animais às culturas, o controlo da utilização de fezes de animais como fertilizante e a educação dos trabalhadores para a higiene na agricultura. No controlo pós-colheita deve incluir-se o desenvolvimento e uso de

desinfecção química e física, a lavagem dos produtos e educação dos manipuladores em termos de higiene e segurança alimentar (Dixon *et al.*, 2013).

Além da adoção de medidas preventivas há ainda a necessidade urgente de desenvolver e avaliar novos medicamentos e tratamentos para ambos os parasitas com menos efeitos colaterais, bem como testes de diagnóstico que forneçam resultados eficientes e sejam simples de realizar (Carvalho, 2009 e Johnston *et al.*, 2003).

Em conclusão, é de extrema importância a adoção de medidas de controlo e prevenção relativamente a estes protozoários parasitas ao longo de todo o processamento das saladas, de modo a evitar a infeção nos consumidores e as consequentes implicações que terá na sua saúde.



# **Referências bibliográficas**



## Referências bibliográficas

ADAM, R. D. - Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, (2001), 447-475.

ALMEIDA, A., POZIO, E., CACCIÒ, M. - Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, (2010), 1895-1901.

APPELBEE, A. J. [et al.] - Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta. *Veterinary Parasitology*, 112, (2003), 289-294.

ARAÚJO, R. - Quantificação e caracterização genotípica de *Cryptosporidium spp.* isolados de água bruta superficial e esgoto bruto para a monitorização em mananciais de abastecimento público na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP). São Paulo: [S.n.], 2015. Tese de doutoramento.

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica – HACCP Hazard Analysis and Critical Control Point. 2007. [Acedido a 3 de outubro de 2018]. Disponível na Internet: [www.asae.pt](http://www.asae.pt)

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - Perigos de Origem Alimentar. 2018 [Acedido a 3 de outubro de 2018]. Disponível na Internet: [www.asae.pt](http://www.asae.pt)

BAPTISTA, P., VENÂNCIO, A. - Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. Forvisão, (2003).

BROGLIA, A. [et al.] - Molecular typing of *Giardia duodenalis* isolates from German travelers. *Parasitology Research*, 112, (2013), 3449-3456.

CACCIO, S. M. [et al.] - Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, 21, (2005), 430-437.

CARVALHO, T. T. R. - Estado atual do conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. *Revista de Patologia Tropical*, 38, (2009), 1-16.

CARVALHO-ALMEIDA T. T. [et al.] - Detection of *Cryptosporidium sp.* in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48, (2006).

CASTRO, H. – Giardíase: considerações práticas. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, 17, (2001), 57-61.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. Giardiasis. 2017a. [Acedido a 6 de outubro de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. Cryptosporidiosis. 2017b. [Acedido a 6 de outubro de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>

CHAVES, R. D. [et al.] – *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat leafy vegetables. Food Hygiene and Toxicology in ready-to-eat foods, 8, (2016), 123-149.

COIMBRA, N. M. M. – Avaliação de Fatores de Risco nas Saladas Prontas a Consumir em Refeitórios Públicos. (2015). Dissertação de Mestrado.

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

EFSA - European Food Safety Authority - About EFSA [Acedido a 2 de outubro de 2018]. Disponível na internet: <http://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa>

FENG, Y., XIAO, L. - Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clinical Microbiology Reviews, 24, (2011), 110-140.

FERNANDES, S. [et al.] – Protocolo de parasitoses intestinais. Acta Pediátrica Portuguesa, 43, (2012), 34-40.

FONSECA, M. J. O., SOARES, A. G., JÚNIOR, M. F. - Processamento Mínimo de Vegetais. Embrapa Agroindústria de Alimentos, 103, (2009).

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

FREGONESI, B. M. [et al.] – *Cryptosporidium* e *Giardia*: desafios em águas de abastecimento público. O mundo da saúde, São Paulo, 36, (2012), 602-609.

GAMBA, R. C. [et al.] – Detection of *Cryptosporidium* sp. Oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, S. Paulo – Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 31, (2000).

GARCIA, L. S., SHIMIZU R. Y. - Evaluation of Nine Immunoassay Kits (Enzyme Immunoassay and Direct Fluorescence) for Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in Human Fecal Specimens. Journal of Clinical Microbiology, 35, (1997), 1526-1529.

HELLER, L. [et al.] - Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. Epidemiologia e Serviços de Saúde, 13, (2004), 79-92.

HILL, D. R. - *Giardia lamblia*. Principles and Practice of Clinical Parasitology, 10, (2001), 219-241.

HILLMAN, A. [et al.] - Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda (*Isoodon obesulus*). International Journal for Parasitology: Parasites and wildlife, 5, (2016), 110-115.

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

HUNTER, P. R., THOMPSON, R. C. A. - The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 35, (2005), 1181-1190.

JOHNSTON, S. P. [et al.] - Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Organisms in Fecal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, (2003), 623-626.

LALLO, M. A., BONDAN, E. F. - Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães de instituições da cidade de São Paulo. *SciELO*, (2005).

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

LALONDE, L. F., GAJADHAR, A. A. - Detection of *Cyclospora cayentanensis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii* on imported leafy green vegetables in Canadian survey. *Food and Waterborne Parasitology*, 2, (2016), 8-14.

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

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

LYU, Z. [et al.] - A new species of *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcomastigophora: Hexamitidae) in hamsters. *Parasites & Vectors*, 11, (2018).

MACKENZIE, W. R. [et al.] - A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*, 331, (1994), 161-167.

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

MORRISON, H. G. [et al.] - Genomic Minimalism in the Early Diverging Intestinal Parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317, (2007), 1921-1926.

MOURA, F. L. - Avaliação dos fatores de risco de saladas embaladas prontas a consumir. Estoril, Portugal (2016). Dissertação de mestrado.

NASH, T. E. [et.al] - Experimental Human Infections with *Giardia lamblia*. The Journal of Infectious Diseases, 156 (1987), 974-984.

OLIVEIRA, A. [et al.] - Doenças transmitidas por alimentos principais agentes etiológicos e aspetos gerais: uma revisão. HCPA, 0, (2010), 279-285.

OLIVEIRA, M. A. [et al.] – Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. Food Control, 22, (2011), 1400-1403.

PEDROSO, R. F., AMARANTE, M. K. - Giardíase: Aspectos Parasitológicos e Imunológicos. Biosáude, Londrina, 8, (2006), 61-72).

PEREIRA, A. C. M. - Detecção dos protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium sp.* em saladas pré-embaladas. Universidade de Coimbra, (2016). Dissertação de mestrado.

PEREIRA, J. T. [et.al] - *Cryptosporidium spp.*: para controlar é necessário conhecer. Health and Environment Journal, 10, (2009), 13-25.

PEREIRA, M. A. - Ocorrência de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* em hortaliças da região metropolitana de campinas (SP), sua relação com a comunidade de trabalhadores e com a área agrícola. Universidade estadual de Campinas, Instituto de Biologia, (2008). Tese de doutoramento.

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

PINA, I. L. T. – Detecção de *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Escherichia coli* em vegetais consumidos crus e possíveis implicações em saúde pública. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, (2017). Dissertação de mestrado.

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

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

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

RYAN U., CACCIÒ S. M. – Zoonotic potencial of *Giardia*. International Journal of Parasitology, 43, (2013), 943-956.

SANTOS, T. B. A. [et al.] – Microorganismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processadas. Brazilian Journal of Food Technology, 13, (2010), 141-146.

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

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

SILVA, C. G. M., ANDRADE, S. A. C., STAMFORD, T. L. M. - Ocorrência de *Cryptosporidium spp.* e outros parasitas em hortaliças consumidas “in natura”, no Recife. *Ciência e saúde coletiva*, 10, (2005), 63-69.

SILVA, E. O. [et al.] – Processamento Mínimo de Produtos Hortifrutícolas. *Embrapa Agroindústria Tropical*, 139, (2011).

SPRONG, H. [et al.] - Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 3(12):e558 (2009).

TABAN, B., HALKMAN, A. K. - Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, 17, (2011), 286-287.

THOMPSON, R. C., HOPKINS, R. M., HOMAN, W. L. - Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today*, 16, (2000), 210-213.

THOMPSON, R. C. A., ASH, A. - Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics, Evolution*, 40 (2016), 315-323.

THOMPSON, R. C. A., KOH, W. H., CLODE, P. L. - *Cryptosporidium* - what is it? *Food and Waterborne Parasitology*, 4, (2016), 54-61.

VERWEIJ, J. J. [et al.] – Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, (2004), 1220-1223.

WATANABE, Y., KIMURA, K., YANG, C-H, OOI, H-K - Detection of *Cryptosporidium sp.* Oocyst and *Giardia sp.* Cyst in Faucet Water Samples from Cattle and Goat Farms in Taiwan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67, (2005), 1285-1287.

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

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

YAMOUDY, M. [et al.] - Isolation of toxigenic *Clostridium difficile* from ready-to-eat salads by multiplex polymerase chain reaction in Isfahan, Iran. *Advanced Biomedical Research*, 4, (2015) 87.