



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Andrea Cristina Rodrigues dos Santos

PESQUISA DOS PROTOZOÁRIOS *GIARDIA* E
CRYPTOSPORIDIUM EM MOLUSCOS BIVALVES ATRAVÉS
DE TÉCNICAS MOLECULARES

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.

Fevereiro de 2019

Andrea Cristina Rodrigues dos Santos

Pesquisa dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* em moluscos bivalves através de técnicas moleculares

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

Fevereiro de 2019

FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



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

Agradecimentos

A realização desta dissertação de mestrado contou com apoios e encorajamentos sem os quais não seria possível tornar-se realidade, pelo que serei eternamente grata.

À Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa, orientadora da dissertação, agradeço todo o apoio dado, o interesse no meu trabalho mesmo fora do laboratório e o facto de ter sempre acreditado nas minhas capacidades e força de vontade para realizar este projeto ao longo desta jornada. Agradeço também a disponibilidade, o saber que transmitiu e a ajuda nos momentos mais difíceis tanto no trabalho laboratorial como na escrita da tese.

Obrigada.

À Doutora Clarissa Faria, que apesar de estar no Brasil, disponibilizou sempre um pouco do seu tempo para nos auxiliar e esclarecer certos pontos do trabalho realizado. Obrigada.

Às “meninas do Lab” Margarida, Sofia, Graciela, Sílvia e Ana, agradeço todo o apoio prestado, companhia e bom ambiente de trabalho nas longas horas passadas no laboratório.

À técnica Sandra e à D. Maria José, agradeço o apoio e a disponibilidade na preparação e organização do material necessário no dia a dia de trabalho laboratorial para que nada faltasse na realização deste trabalho.

A toda a minha família, em especial aos meus pais e ao meu irmão, por terem sempre acreditado em mim, por terem sempre aceite os meus desafios e as minhas lutas ao longo da minha vida e nunca terem desistido de lutar comigo. Um obrigada não chega, amo-vos muito.

Um grande e especial obrigada à minha Avó Maria por ter sido desde sempre um exemplo para mim e por ter sido o meu porto de abrigo e por ter sempre acreditado em mim com uma força inimaginável que ambas sabemos o significado, pois cada conquista era de ambas. Obrigada do fundo do coração “voínha”.

Às minhas amigas e afilhadas de curso Daniela, Lara e Rita, por me terem acompanhado neste longo caminho académico, amadurecendo e crescendo comigo. Obrigada chiquititas por terem sido minhas companheiras nas horas de maior aflição, e por me terem dado sempre apoio e ânimo para continuar a lutar, “Levo-vos comigo para a vida”.

À Dani, por teres sido mais que amiga ao longo desta etapa da minha vida, apoiando-me naquilo que precisava, dando-me forças para não desistir. Obrigada por todas as ideias e ajudas que me deste para a realização desta tese.

Ao CUMN (Centro Universitário Manuel da Nóbrega), às missas de quarta-feira e à minha CVX-U por ter sido a minha segunda casa e o meu refúgio espiritual, onde conseguia encontrar-me com Deus e pedir sempre força, paciência, perseverança e coragem para continuar a seguir o meu caminho. Obrigada.

Por fim, o melhor, o mais sincero e eterno obrigada ao Nuno, meu namorado, meu amigo, meu companheiro de armas. Não há palavras para descrever a tua paciência para comigo, por teres sempre dito “Vai...tu consegues” e nunca me teres deixado desistir e de lutar pela realização desta tese de mestrado. Obrigada do fundo do coração.

Índice

| | |
|---|-----|
| Índice | i |
| Índice de Tabelas | ii |
| Índice de Figuras | iii |
| Abreviaturas..... | v |
| Resumo | vii |
| Abstract..... | ix |
| Capítulo 1 | 1 |
| 1. Introdução | 3 |
| 1.1. Segurança Alimentar | 3 |
| 1.1.1. Transmissão de doenças através de alimentos | 5 |
| 1.2. Segurança alimentar relativamente ao consumo de moluscos bivalves | 10 |
| 1.3. Protozoários | 11 |
| 1.3.1. <i>Giardia lamblia</i> | 11 |
| 1.3.2. <i>Cryptosporidium</i> spp. | 14 |
| Capítulo 2 | 19 |
| 2. Objetivos..... | 21 |
| Capítulo 3 | 23 |
| 3. Materiais e Métodos..... | 25 |
| 3.1. Caracterização das amostras de moluscos bivalves | 25 |
| 3.2. Extração de ADN | 25 |
| 3.3. Amplificação dos marcadores genéticos de <i>Cryptosporidium</i> por nested-PCR..... | 26 |
| 3.4. Amplificação dos marcadores genéticos de <i>Giardia</i> por nested-PCR..... | 28 |
| 3.5. Visualização dos fragmentos de ADN amplificados..... | 28 |
| 3.6. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)..... | 29 |
| 3.6.1. <i>Cryptosporidium</i> spp. | 29 |
| 3.6.2. <i>Giardia lamblia</i> | 30 |
| 3.7. Sequenciação..... | 31 |
| Capítulo 4 | 33 |
| 4. Resultados | 35 |
| 4.1. Deteção de <i>Cryptosporidium</i> spp. por nested-PCR e qPCR | 35 |
| 4.2. Deteção de <i>G. lamblia</i> por nested-PCR e qPCR..... | 36 |
| 4.3. Identificação de espécies/genótipos de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> por sequenciação..... | 39 |
| Capítulo 5 | 43 |
| 5. Discussão | 45 |
| Referências Bibliográficas | 49 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Exemplos de doenças microbianas transmitidas por alimentos | 6 |
| Tabela 2 – Parasitas patogênicos associados a doenças transmitidas por alimentos | 9 |
| Tabela 3 – Espécies de <i>Giardia</i> , genótipos de <i>Giardia lamblia</i> e seus hospedeiros | 12 |
| Tabela 4 – Espécies de <i>Cryptosporidium</i> e respectivos hospedeiros | 15 |
| Tabela 5 – Identificação e caracterização das amostras dos moluscos bivalves..... | 25 |
| Tabela 6 – Composição da mistura usada nas reações de nested-PCR para amplificação de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia lamblia</i> | 27 |
| Tabela 7 – Composição da mistura usada nas reações de qPCR para amplificação de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia lamblia</i> | 30 |
| Tabela 8 – Detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp. em amostras de moluscos bivalves por nested-PCR e qPCR. | 36 |
| Tabela 9 – Detecção de <i>Giardia lamblia</i> em amostras de moluscos bivalves por nested-PCR do gene <i>ssu rRNA</i> | 37 |
| Tabela 10 – Homologia das sequências do gene <i>ssu rRNA</i> de <i>Giardia</i> das amostras de ostras em estudo com as disponíveis no <i>GenBank</i> | 40 |
| Tabela 11 – Diferenciação dos genótipos de <i>G. lamblia</i> com base nas posições nucleotídicas do gene <i>ssu rRNA</i> | 41 |
| Tabela 12 – Genotipagem de <i>Giardia lamblia</i> com base nas posições nucleotídicas do gene <i>ssu rRNA</i> | 42 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> | 13 |
| Figura 2 – Quisto e trofozoíto de <i>Giardia lamblia</i> | 14 |
| Figura 3 – Ooquistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em microscopia ótica após coloração de Ziehl-Neelsen modificada..... | 16 |
| Figura 4 – Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp..... | 17 |
| Figura 5 – Electroforese em gel de agarose a 2% e coloração com brometo de etídeo de amplicões do nested-PCR do gene <i>ssu rRNA</i> de <i>Cryptosporidium</i> spp..... | 35 |
| Figura 6 – Curvas de amplificação e curvas de <i>melting</i> do qPCR do gene <i>18S rDNA</i> de <i>Cryptosporidium</i> spp. | 36 |
| Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose a 2% e coloração com brometo de etídeo de amplicões do nested-PCR do gene <i>ssu rRNA</i> de <i>Giardia lamblia</i> | 38 |
| Figura 8 – Curvas de amplificação e curvas de <i>melting</i> do qPCR do gene <i>orfC4</i> dos genótipos A e B de <i>G. lamblia</i> | 39 |
| Figura 9 – Curvas de amplificação e curvas de <i>melting</i> do qPCR do gene <i>orfC4</i> de <i>Giardia lamblia</i> genótipo A. | 39 |
| Figura 10 – Alinhamento múltiplo de fragmentos das sequências do gene <i>ssu rRNA</i> de <i>G. lamblia</i> da amostra RioL 24..... | 40 |

Abreviaturas

| | |
|-----------------|--|
| ADN | Ácido Desoxirribo nucleico |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin</i> – Albumina de Soro bovino |
| CDC | Centro de Controlo e Prevenção de Doenças |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> |
| EU | Estados-Membros da União europeia |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FAO | Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação |
| HACCP | <i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i> - Plano de Pontos Críticos de Controlo |
| JECFA | <i>Expert Committee on Food Additives</i> |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| <i>orfC4</i> | <i>Open read frame C4 gene</i> – Gene quadro aberta de leitura C4 |
| pb | Pares de bases |
| PCC | Ponto Críticos de Controlo |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da Polimerase |
| <i>ssu rRNA</i> | Gene da subunidade menor do RNA ribossomal |

Resumo

Giardia e *Cryptosporidium* são dois protozoários que infetam o homem e animais, tendo sido detetados com alguma frequência em moluscos bivalves. Ambos parasitas têm ciclos de vida adequados para que haja infeção e transmissão por via hídrica e pelos alimentos. Osquistos de *Giardia* e os ooquistos de *Cryptosporidium* são as formas infetantes e são muito resistentes às condições ambientais e aos tratamentos químicos efetuados à água para consumo humano. Estas estruturas de resistência permanecem viáveis na água durante meses podendo contaminar o homem e animais bem como a fauna aquática nomeadamente moluscos bivalves.

Em Portugal é escassa a pesquisa destes protozoários em alimentos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo pesquisar *Giardia* e *Cryptosporidium* em moluscos bivalves através de técnicas moleculares e fazer uma análise do risco alimentar para a saúde pública associado ao consumo destes moluscos.

Ostras de três espécies, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* e *Crassostrea angulata*, foram recolhidas em diferentes zonas de Portugal pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) no período de 2011 a 2017. O ADN das ostras (n=190) foi extraído utilizando-se o kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen) e a deteção de *Giardia* e *Cryptosporidium* foi realizada por técnicas de PCR (nested-PCR e qPCR). A identificação das espécies e genótipos foi realizada por sequenciação.

O locus do gene *ssu rRNA* de *Giardia* foi amplificado por nested-PCR em 29 amostras de ostras (15,3%). Destas 29 amostras positivas, só 12 amostras foram sequenciadas com sucesso. O alinhamento das sequências identificou a espécie *Giardia lamblia* em todas as amostras com 99-100% de homologia com sequências de referência. Através do estudo das posições nucleotídicas foram caracterizadas 10 amostras no genótipo A. Recorrendo ao qPCR específico dos genótipos A e B, genótipos responsáveis pela doença no homem, foi possível identificar o genótipo A de *Giardia lamblia* em 28 amostras.

Relativamente à deteção do protozoário *Cryptosporidium*, 17 amostras apresentaram fraca amplificação no nested-PCR e como não ocorreu amplificação no qPCR foram consideradas negativas.

Em conclusão, as técnicas de biologia molecular foram aplicadas com sucesso, detetou-se o genótipo A de *G. lamblia* em ostras, podendo o seu consumo representar um risco para a saúde pública.

Palavas-chave: moluscos bivalves, ostras, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., doenças transmitidas pela água, segurança alimentar, qPCR, nested-PCR, sequenciação.

Abstract

Giardia and *Cryptosporidium* are two protozoan that infect man and animals and have been detected with some frequency in bivalve molluscs. Both parasites have adequate life cycles for infection and transmission by water and food. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts are the infective forms and are very resistant to environmental factors as well as to chemical treatments applied to water for human consumption. These resistance structures remain viable in the water for months and may contaminate man and animals as well as aquatic fauna including bivalve molluscs.

In Portugal the research of these protozoans in food is scarce. Thus, the present work aimed to investigate the presence of *Giardia spp.* and *Cryptosporidium spp.* in bivalve molluscs applying molecular techniques and to make an analysis of the food risk to public health associated to their consumption.

Oysters of three species, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulate*, were collected in different areas of Portugal by the Portuguese Institute of the Sea and Atmosphere (IPMA) between 2011 and 2017. Oyster DNA (n=190) was extracted using the kit *Tissue DNA Extration* (Qiagen) and the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* was performed by PCR techniques (nested-PCR and qPCR). The identification of the species and genotypes was performed by sequencing.

The *locus* gene *ssu* rRNA of *Giardia* was amplified by nested-PCR in 29 oyster samples (15.3%). However, it was only possible to sequence 12 samples. Sequence alignment identified the *Giardia lamblia* in all samples, with 99-100% homology with reference sequences, and allowed to identify genotype A in 10 samples. Using specific-qPCR of genotype A and B, genotypes responsible for the disease in humans, allow the identification of *G. lamblia* genotype A in 28 samples.

Regarding the detection of *Cryptosporidium*, 17 samples showed weak amplification in the nested-PCR and no amplification in the qPCR, and so were considered negative.

In conclusion, the molecular biology techniques were successfully applied, detecting genotype A of *G. lamblia* in oysters. The consumption of this shellfish food could pose a risk to public health.

Keywords: Bivalves mollusks, oysters, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., waterborne diseases, food safety, qPCR, nested-PCR, sequencing.

Capítulo I

Introdução

I. Introdução

I.1. Segurança Alimentar

A 1ª Cimeira Mundial da Alimentação, 1996, definiu o conceito de Segurança Alimentar como “situação quando as pessoas, a qualquer momento, têm acesso físico e económico a uma quantidade de alimentos seguros e nutritivos, que satisfaçam as necessidades de uma dieta que permita uma vida ativa e saudável”. Refere-se a esta como a produção, transformação, distribuição e fornecimento de alimentos que não prejudiquem a saúde dos consumidores. Logo, a segurança alimentar requer o manuseio adequado desde a produção até o consumo.

Tanto a segurança alimentar quanto a qualidade alimentar estão intrinsecamente ligadas, particularmente em locais onde os suprimentos alimentares são inseguros (WHO, 2017a). Ambos estão relacionados com a análise de vários parâmetros como a avaliação de risco, parâmetros toxicológicos, farmacológicos e microbiológicos (ASAE, 2017).

Uma das áreas de trabalho da Organização Mundial de Saúde (OMS) é a promoção de alimentos seguros e saudáveis, intervindo na implementação de avaliações científicas de riscos. As *guidelines* servem para orientar e promover uma melhor resposta a nível da comunicação do risco de modo a que todos os Estados Membros da Organização das Nações Unidas (ONU) tenham acesso às informações, melhorando e prevenindo o controlo de doenças transmitidas pelos alimentos (WHO, 2017a).

Várias organizações foram criadas para implementar normas e legislação, associadas à segurança e qualidade alimentar. A *Expert Committee on Food Additives* (JECFA) criada em 1956 é uma organização de peritos científicos internacionais, que trabalha conjuntamente com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a OMS para avaliar a segurança dos aditivos alimentares. Posteriormente, foi incluída a avaliação de contaminantes tóxicos ou naturais e resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos (WHO, 2017b).

O *Codex Alimentarius* membro da FAO e da OMS, foi criado em 1963 para implementar normas alimentares internacionais de modo a proteger a saúde dos consumidores e garantir práticas comerciais mais justas em todo o mundo (WHO, 2017c). O objetivo do *Codex Alimentarius* é estabelecer segurança e qualidade nos alimentos em todo o mundo. Assim, os consumidores podem confiar na segurança e qualidade dos alimentos que compram e os importadores confiarem que os alimentos estarão de acordo com suas especificações (WHO, 2017c).

A *European Food Safety Authority* (EFSA) é uma agência europeia financiada pela União Europeia (UE) que foi criada em 2002 após uma série de crises alimentares no final da década de 1990. O objetivo é comunicar ao mais rapidamente possível os riscos existentes e emergentes que ocorrem ao longo da cadeia alimentar, garantindo a proteção da saúde pública da UE e um melhor controlo do Mercado Europeu, sendo legalmente estabelecido pela UE sob a lei geral alimentar (EFSA, 2017).

A contaminação de alimentos por microrganismos é uma preocupação para a Saúde Pública mundial. Muitos países já reportaram a ocorrência de doenças causadas por microrganismos nos alimentos, incluindo agentes patogénicos como bactérias (*Salmonella spp.* e *Escherichia coli* enterohemorrágica) e parasitas (*Cryptosporidium spp.* e trematodas) (WHO, 2017d).

I.1.1. Transmissão de doenças através de alimentos

A transmissão de doenças por alimentos pode ser causada por contaminantes: físicos, como fragmentos de vidro, metal, plástico ou madeira, pedras, agulhas, espinhas, cascas, areia, adornos, ou outros materiais estranhos que possam causar dano ao consumidor; químicos, como pesticidas, contaminantes inorgânicos tóxicos, antibióticos, promotores de crescimento, aditivos alimentares tóxicos, lubrificantes, tintas, toxinas do marisco (PSP, DSP), histamina (pescado), micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina), dioxinas, nitrosaminas, partículas dos materiais de embalagem; e biológicos, bactérias, vírus e parasitas patogênicos (ASAE, 2007).

Os antibióticos são utilizados na medicina veterinária e humana de modo excessivo no tratamento de infecções causadas por bactérias, surgindo problemas de disseminação de bactérias multirresistentes ao longo da cadeia alimentar (WHO, 2018).

O desenvolvimento da economia na indústria alimentar, o aparecimento das novas tendências alimentares, o desenvolvimento do comércio e o interesse do consumidor em saber cada vez mais sobre o valor nutricional dos alimentos, faz com que haja um maior controle da qualidade e segurança dos alimentos (Boqvist *et al.*, 2018).

Embora as políticas alimentares e nutricionais tenham evoluído globalmente ao longo dos anos, os progressos são desiguais e surtos de contaminação alimentar causados por microorganismos, químicos e toxinas são comuns em muitos países (WHO, 2007). Existem mais de 250 doenças transmitidas por alimentos, a maioria das quais são causadas por bactérias, seguidas por vírus e parasitas (Tabela I). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 2,2 milhões pessoas em todo o mundo poderão morrer de doenças diarreicas causadas por bactérias, vírus e parasitas (WHO, 2006a; WHO, 2006b)

Tabela 1 – Exemplos de doenças microbianas transmitidas por alimentos (Adaptado de Switaj et al., 2015).

| Microorganismos (nome comum das doenças) | Tempo de incubação | Sinais e Sintomas | Tempo de duração | Fonte de alimentos |
|--|---|--|------------------------------|--|
| <i>Bacillus cereus</i> (Intoxicação alimentar) | 10 a 16 horas | Dores abdominais, náuseas, diarreia aquosa. | 24 a 48 horas | Molhos, guisados, molho de baunilha. |
| <i>Campylobacter jejuni</i> (campilobacteriose) | 2 a 5 dias | Dores abdominais, diarreia (por vezes com sangue), febre e vômitos. | 2 a 10 dias | Água contaminada, frango mal cozinhado, leite não pasteurizado |
| <i>Clostridium botulinum</i> (botulismo) | 12 a 72 horas | Visão turva, diarreia, dificuldade em respirar, fraqueza muscular, vômitos; pode ocorrer paragem respiratória podendo levar à morte. | Tempo variável | Carnes de fumeiro (presunto, chouriços). |
| <i>Clostridium perfringens</i> (intoxicação alimentar) | 8 a 16 horas | Dores abdominais intensas, diarreia aquosa. | Normalmente dura 24 horas | Alimentos pré-aquecidos, carnes de aves mal cozinhadas. |
| <i>Escherichia coli</i> (diarreia do viajante) | 1 a 3 dias | Dores abdominais, vômitos, diarreia aquosa. | 3 a 7 dias | Alimentos ou água expostos a contaminação fecal. |
| <i>E. coli</i> O157:H7 (Shiga toxina) | 1 a 8 dias | Dores abdominais, diarreia severa (com sangue), vômitos; pode causar falha renal. | 5 a 10 dias | Águas, carnes mal passadas (hambúrgueres), leites e sumos não pasteurizados. |
| Vírus da Hepatite A (Hepatite A) | 15 a 50 dias | Dores abdominais, urina escura, diarreia, febre, dores de cabeça, náuseas. | 2 semanas a 3 meses | Água, alimentos que estiveram em contato com um manipulador contaminado, marisco que tenha estado em água contaminada, alimentos mal cozinhados. |
| <i>Listeria monocytogenes</i> (listeriose) | 9 a 48 horas (sintomas gastrointestinais), 2 a 6 semanas (doença invasiva) | Diarreia, febre, dores musculares; grávidas podem ter sintomas de gripe, mas a infeção pode levar a nascimento prematuro ou natimorto; adultos mais velhos ou imunodeprimidos desenvolvem infeção. | Tempo variável | Leite não pasteurizado, queijos feitos com leite não pasteurizado. |
| Norovírus (intoxicação alimentar, gastroenterites intestinais) | 12 a 48 horas | Dores abdominais, diarreia, febre, dores de cabeça, náusea, vômitos. | 12 a 60 horas | Água, alimentos que tenham sido manufacturados por um manipulador contaminado, marisco que tenham estado em contato com água contaminada. |
| <i>Salmonella</i> (salmonelose) | 6 a 48 horas | Dores abdominais, diarreia, febre e vômitos. | 4 a 7 dias | Queijos, ovos, carne de aves mal cozinhada, leite não pasteurizado. |
| <i>Shigella</i> (shigellose) | 4 a 7 dias | Dores abdominais, diarreia, febre, fezes podem conter sangue ou muco. | 24 a 48 horas | Água, alimentos que tenham sido manufacturados por um manipulador contaminado, alimentos mal cozinhados. |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (intoxicação alimentar) | 1 a 6 horas | Dores abdominais, febre, náuseas, vômitos, diarreia. | 24 a 48 horas | Alimentos mal refrigerados, bolos com creme, ovos. |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 4 a 96 horas | Dores abdominais, febre, náuseas, vômitos, diarreia aquosa (por vezes com sangue). | 2 a 5 dias | Marisco mal cozinhado |
| <i>Vibrio vulnificus</i> | 1 a 7 dias | Dores abdominais, diarreia sanguinolenta, febre, úlceras, vômitos, fatal para indivíduos imunodeprimidos. | 2 a 8 dias | Marisco mal cozinhado (especialmente ostras). |

Na indústria alimentar são relatados diversos casos de contaminação de alimentos por agentes patogénicos, resultante das más práticas e do não cumprimento das regras de higienização durante a manipulação dos alimentos (FDA, 2009; Todd *et al.*, 2007).

A contaminação pelos microrganismos pode ocorrer em diversos Pontos Críticos de Controlo (PCC) até chegar ao consumidor, desde da produção, manuseamento e confeção (ASAE, 2017).

Segundo a legislação da UE, relativamente aos critérios de controlo de contaminação microbiológica, os géneros alimentícios não deverão conter microrganismos ou toxinas ou metabolitos em quantidade que representem um risco para a saúde pública (Velusamy *et al.*, 2010). Todos os estados membros da UE são obrigados a recolher dados sobre a ocorrência de zoonoses, resistência antimicrobiana e doenças de origem alimentar (Boqvist, *et al.*, 2018).

Campylobacter spp. continua a ser um dos agentes infecciosos mais frequente e notificado (Boqvist *et al.*, 2018). Estudos recentes na UE mostraram que 80% da população é infetada por *Campylobacter* spp. manifestando ou não sintomas de doença. A EFSA estimou que cerca de 50-80% das infeções por *Campylobacter* spp. são originadas pela ingestão de frango, sendo que é cada vez mais importante o controlo de qualidade nas indústrias de produção de frangos (Cassini *et al.*, 2016).

O Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) estima que um em cada 6 americanos (aproximadamente 48 milhões) ficará doente devido a um agente patogénico transmitido por alimentos, resultando em 128 mil hospitalizações e 3000 mortes por ano. As maiorias das doenças transmitidas por alimentos, tendo resultado em hospitalizações ou óbitos são causadas por oito microrganismos: *Norovirus*, *Salmonella* não *typhi*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (Switaj *et al.*, 2015).

Os principais parasitas causadores de doenças entéricas transmitidas por alimentos e água contaminados são *Cryptosporidium* e *Giardia* (Dawson, 2005; Efstratiou *et al.*, 2017). Estas espécies causam infeção numa grande variedade de hospedeiros vertebrados, sendo responsáveis pela giardíase e a criptosporidiose, doenças muito frequentes mundialmente (Gómez-Couso *et al.*, 2004). Contudo, existem outros parasitas que também causam doenças graves transmitidas pelos alimentos como por exemplo, *Taenia solium*, *Ascaris* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Trichuris trichiura* e *Echinococcus* spp. (Tabela 2) (Robertson *et al.*, 2013).

Os agentes patogénicos que se encontram no Top 10 de doenças relacionadas com água são *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Legionella*, *Norovirus*, *Shigella*, *Campylobacter*,

Salmonella, Vírus da Hepatite A e *Escherichia coli* (CDC, 2014). Os vírus e as bactérias são os mais estudados e reportados apesar dos protozoários terem também um papel importante nesse risco, não são muito estudados (Palos Ladeiro *et al.*, 2013).

Cryptosporidium e *Giardia* são ubíquos no ambiente, sendo maioritariamente encontrados em meio aquático (rios, lagos, águas recreativas) (Newman *et al.*, 2015). O primeiro caso de giardíase de origem hídrica foi reportado em 1966 no Colorado Estados Unidos da América (EUA). Posteriormente, em 1971 o CDC começou a fazer controlo e vigilância da água. Um dos maiores surtos de origem hídrica ocorreu na Noruega em 2004, tendo levado a 1 500 pessoas infetadas (Carmena, 2010).

Relativamente à criptosporidiose, o surto mais marcante por *Cryptosporidium* foi em Milwaukee, Wisconsin (EUA) em 1993, onde 403 000 pessoas foram infetadas por água contaminada, resultando em 4 400 hospitalizações e cerca de 100 mortos. Em 1980 foi documentado um surto no Reino Unido (Dawson, 2005) e em 2010 na Suécia, contaminando cerca de 27 000 pessoas (Boqvist *et al.*, 2018). Nos últimos 30 anos foram registados 165 surtos por *Cryptosporidium* em vários Estados do Norte da América (Newman *et al.*, 2015).

Tabela 2 – Parasitas patogénicos associados a doenças transmitidas por alimentos (Adaptado de Dorny et al., 2009).

| | Protozoários | Helmintas |
|---------------------------|---|--|
| Carne | <i>Toxoplasma gondii</i> | <i>Trichinella</i> spp. |
| | <i>Sarcocystis</i> spp. | <i>Taenia</i> spp. |
| Repteis e anfíbios | | <i>Spirometra</i> spp. |
| | | <i>Gnathostoma</i> spp. |
| | | <i>Diphylobothrium</i> spp. |
| | | <i>Alaria</i> spp. |
| Peixes | | <i>Anikasis</i> spp. |
| | | <i>Capillaria philippinensis</i> |
| | | <i>Gnathostoma</i> spp. |
| | | <i>Diphylobothrium</i> spp. |
| | | <i>Clonorchis sinensis</i> <i>Opisthorchis</i> spp. |
| Artrópodes | <i>Paragonimus</i> spp. | |
| | <i>Macracanthorhynchus hirudinaceus</i> | |
| Moluscos | <i>Giardia</i> spp. | <i>Angiostrongylus cantonensis</i> |
| | <i>Cryptosporidium</i> spp. | <i>Echinostoma</i> spp. |
| Legumes e frutas | <i>Giardia</i> spp. | <i>Fasciola</i> spp. |
| | <i>Cryptosporidium</i> spp. | <i>Fasciolopsis buski</i> |
| | <i>Cyclospora cayetanensis</i> | <i>Echinococcus granulosus</i> |
| | <i>Toxoplasma gondii</i> | <i>Echinococcus multilocularis</i> |
| | <i>Trypanosoma cruzi</i> | |

Os agentes patogénicos transmitidos por alimentos podem causar doenças agudas e crónicas, de diferentes graus de gravidade, levando em certos casos à morte. Na política da segurança alimentar, a relevância dos agentes patogénicos é feita através da comparação quantitativa do seu impacto na saúde pública, sendo uma informação fundamental na tomada de decisões para alertar o sistema de gestão e avaliação de risco (Mangen et al., 2015).

A redução de doenças transmitidas por alimentos pode ser realizada através da análise de cada etapa da cadeia de produção de alimentos. Contudo, é um processo difícil pois depende da identificação da origem dos riscos bem como do processo para os eliminar. No caso das doenças transmitidas pela água são mais fáceis de controlar a nível municipal ou a nível de abastecimento de água individual (Cody e Stretch, 2014).

Assim, o controlo de doenças transmitidas por alimentos continua a ser um desafio, pois os alimentos podem ser contaminados por diversos agentes microbianos e de diferentes origens.

1.2. Segurança alimentar relativamente ao consumo de moluscos bivalves

Em todo o mundo as autoridades responsáveis pela proteção do meio ambiente e da saúde humana estão cada vez mais preocupadas com a qualidade da água do mar. Os ecossistemas costeiros têm sido ameaçados pela eliminação inadequada de esgoto, descargas ilegais de água residuais bem como de resíduos industriais (Ghozzi *et al.*, 2017).

A produção de marisco e seus derivados é muito importante na cultura culinária em muitos países, tendo principalmente um grande impacto económico na zona Mediterrânica, particularmente em Itália, Espanha e França (Giangaspero *et al.*, 2014).

Os moluscos bivalves são frequentemente utilizados como biomarcadores na avaliação da qualidade ambiental, sendo importantes indicadores de poluição química e biológica. Como são organismos que se alimentam de partículas em suspensão, acumulam quantidades consideráveis desses poluentes mesmo que estejam em baixas concentrações (Tei *et al.*, 2016).

A maioria dos moluscos marinhos alimentam-se de fitoplâncton que se encontra suspenso na água através da filtração pelas brânquias, por ação ciliar. Os microrganismos patogénicos que se encontram na água podem ser filtrados pelas brânquias durante a alimentação, concentrando-se no trato intestinal (glândulas digestivas) (Schets *et al.*, 2007).

A qualidade microbiológica dos moluscos bivalves está relacionada com as condições sanitárias das águas onde são produzidos, sendo esta uma preocupação da saúde pública (Souza *et al.*, 2012). As fezes de origem humana e animal podem contaminar diversos ambientes como por exemplo terras agrícolas, águas urbanas, águas residuais, rios e águas costeiras levando à contaminação da água do mar. Se a contaminação chegar aos moluscos, estes quando ingeridos crus pelos consumidores, podem representar um risco potencial para a saúde pública (Giangaspero *et al.*, 2014).

As biotoxinas também são uma outra preocupação para a segurança alimentar relativamente ao consumo dos bivalves pois são responsáveis por originar intoxicações agudas no homem, embora não afetam aparentemente os moluscos infetados (Burri e Vale, 2006; Vale, 2004). A deteção das biotoxinas não é fácil pois são compostos que não alteram a cor

da água do mar e o marisco contaminado não apresenta alterações no odor, cor ou sabor (Vale, 2004).

Atendendo à capacidade filtradora dos moluscos bivalves é espectável que as estruturas infecciosas suspensas na água sejam concentradas nos moluscos (Adell *et al.*, 2014; Palos Ladeiro *et al.*, 2014). Vários estudos demonstraram que os quistos *Giardia* e os ooquistos *Cryptosporidium* são acumulados e concentrados nos moluscos, tendo-se encontrado *Cryptosporidium* em mexilhão e berbigão, destinados para alimentação humana, e *Giardia* em ostras e ameijoia (Schets *et al.*, 2007; Robertson, 2007).

Os quistos de *Giardia* e os ooquistos de *Cryptosporidium* são resistentes ao tratamento à base de cloro, conseguindo sobreviver por longos períodos de tempo na água, sendo difícil a sua eliminação. Os ooquistos de *Cryptosporidium* apresentam um problema adicional, pois não são facilmente removidos pelos processos de filtração de água devido ao seu tamanho (5µm) (Adell *et al.*, 2014). Os ooquistos de *Cryptosporidium* têm uma parede espessa que oferece resistência ao parasita e permite a sua sobrevivência durante longos períodos de tempo (Tei *et al.*, 2016). Como as estruturas parasitárias conseguem sobreviver no trato digestivo dos moluscos bivalves podem causar infecção nos humanos a quando da sua ingestão (Melo *et al.*, 2006).

A ocorrência de surtos diarreicos periódicos desencadeados pelo consumo de moluscos bivalves têm contribuído para a desconfiança pública relativamente à segurança na produção de marisco que por sua vez contribui para perdas económicas na Indústria de aquicultura (Souza *et al.*, 2012). Deste modo é relevante esclarecer o papel dos moluscos bivalves como vetores de transporte de parasitas que podem provocar infeções aos humanos.

1.3. Protozoários

Os protozoários são parasitas unicelulares, tendo alguns um ciclo de vida complexo. *Giardia*, *Cryptosporidium* e *Toxoplasma gondii* são parasitas que se encontram em todo o mundo e estão associados a infeções no homem e animais. *Giardia* e *Cryptosporidium* são pesquisados normalmente em conjunto devido a sua transmissão ser muito semelhante e por terem vetores de infeção comuns, nomeadamente a água e alimentos (Selstad *et al.*, 2015).

1.3.1 *Giardia lamblia*

Giardia é um protozoário binucleado flagelado que vive e reproduz-se no intestino,

causando infeções em mamíferos, aves, répteis e anfíbios (Tabela 3) (Palos Ladeiro *et al.*, 2013; Lopez-Romero *et al.*, 2015).

Giardia lamblia (sinónimo de *Giardia duodenalis* ou *Giardia intestinalis*) é a espécie que infeta humanos e mamíferos e engloba genótipos molecularmente distintos (A-G), uns específicos do hospedeiro animal (C-G) e outros que circulam no homem e nos animais (A-B) (Tabela 3) (Willis *et al.*, 2015). Os humanos só são infetados pelos genótipos A e B, sendo o genótipo B o mais comum em todo o mundo. Os genótipos C e D infetam apenas os cães. O genótipo E infeta animais de casco, o genótipo F os gatos e genótipo G os roedores (Lopez-Romero *et al.*, 2015).

Tabela 3 – Espécies de *Giardia*, genótipos de *Giardia lamblia* e seus hospedeiros (Adaptada de Carmena, 2010).

| Espécies | Hospedeiros | Infeções em Humanos | Surtos de doenças transmitidas por água | Reportado na água |
|---|-------------|---------------------|---|-------------------|
| <i>G. duodenalis</i> | Mamíferos | Sim | Sim | Sim |
| <i>G. agilis</i> | Anfíbios | Não | Não | Não |
| <i>G. muris</i> | Roedores | Não | Não | Não |
| <i>G. ardeae</i> | Pássaros | Não | Não | Não |
| <i>G. psittaci</i> | Pássaros | Não | Não | Não |
| <i>G. microti</i> | Roedores | Não | Não | Não |
| Genótipos (assemblages) de <i>Giardia lamblia</i> | | | | |
| A | Mamíferos | Sim | Sim | Sim |
| B | Mamíferos | Sim | Não | Sim |
| C/D | Cão | Não | Não | Não |
| E | Gado bovino | Não | Não | Não |
| F | Gato | Não | Não | Não |
| G | Rato | Não | Não | Não |

O ciclo de vida é relativamente simples alternando entre duas formas morfológicas: trofozoíto (forma vegetativa) ou quisto (Figura 1). A infeção inicia-se com a ingestão dos quistos através de água ou alimentos contaminados. No estômago, em contacto com um pH ácido, ocorre a indução do desenquistamento do trofozoíto. Nas primeiras proporções do intestino, o quisto dá origem a dois trofozoítos que se multiplicam assexuadamente ou divisão binária colonizando o intestino. Ao longo do intestino, ocorre a fase de enquistamento dos trofozoítos devido à alteração do pH, formando-se os quistos, que são eliminados nas fezes

(forma infetante). As fezes podem contaminar o ambiente e conseqüentemente, a água e os alimentos (Palos Ladeiro *et al.*, 2013). O ciclo completa-se com uma nova infecção através do contato fecal-oral (Lopez-Romero *et al.*, 2015; CDC, 2017).

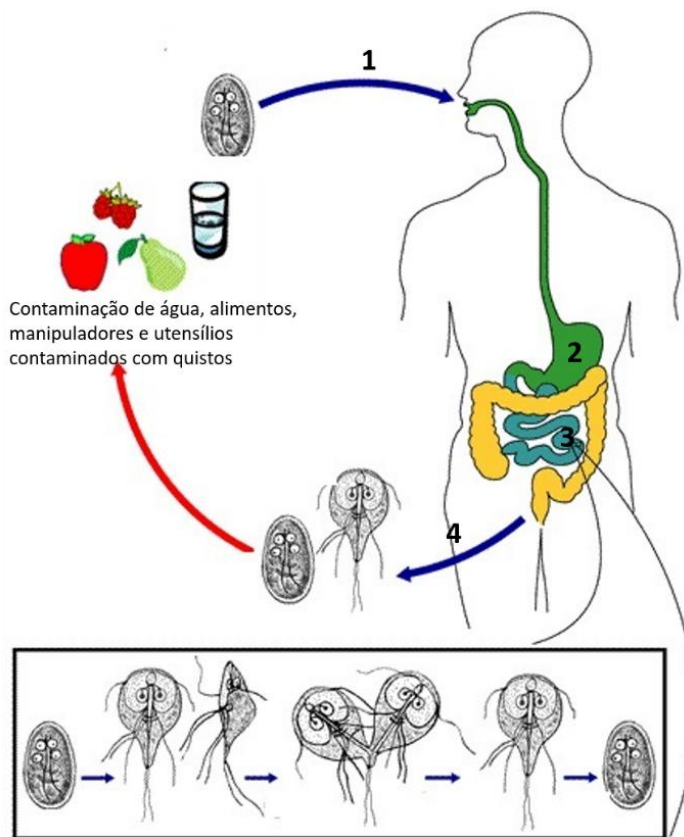


Figura 1 – Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. 1- Ingestão de quistos através de alimentos, água, mãos ou utensílios contaminados por quistos; 2 - Quisto no estômago, em contato com pH ácido, ocorre desenquistamento no intestino; 3 - Ocorre divisão binária no intestino (Adaptado de <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>).

Os quistos de *G. lamblia* medem cerca de 12–15 μm e podem ser transmitidos diretamente de pessoa para pessoa, ou indiretamente através da água e alimentos (Figura 2). A facilidade de dispersão ambiental, resistência a desinfetantes comuns, baixa dose infecciosa (apenas 10 quistos), diversidade de hospedeiros e distribuição mundial tornam *G. lamblia* um parasita de elevado risco para a saúde pública (Willis *et al.*, 2015).

Os quistos de *Giardia* são muito resistentes conseguindo sobreviver em meio aquático por longos períodos de tempo sendo detetados em águas superficiais, águas subterrâneas, poços e águas recreativas (piscinas e jacuzzis) (Willis *et al.*, 2015).

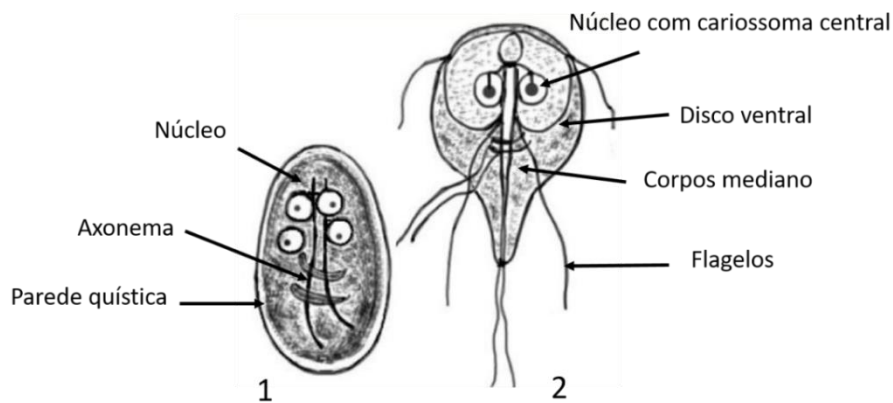


Figura 2 – Quisto (1) e trofozoíto (2) de *Giardia lamblia*. (Adaptado de <http://www.biologia.seed.pr.gov.br/modules/galeria/detalhe.php?foto=956&evento=4>).

Giardiase é geralmente autolimitante podendo persistir durante duas a quatro semanas. Os sintomas clínicos variam muito desde diarreia aguda ou crônica com dores abdominais (cólicas abdominais), mal estar, flatulência, perda de peso, fezes gordurosas e síndrome de má absorção (Ladeiro *et al.* 2013; Lopez-Romero *et al.*, 2015). Existe uma maior prevalência de giardiase nos países em desenvolvimento, apresentando uma prevalência que varia entre 1 a 50%, ao contrário dos países desenvolvidos em que a sua prevalência é de entre 0-4 a 7% (Lopez-Romero *et al.*, 2015).

1.3.2 *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium é um parasita protozoário do Filo Apicomplexa com ciclo de vida monoxeno, que causa doenças numa grande variedade de animais vertebrados, incluindo o homem (Koloren e Ayaz, 2016). *Cryptosporidium* é um dos principais agentes patogênicos transmitido pela água, sendo causador de gastroenterites e infecção oportunista em indivíduos imunocomprometidos (Pagoso e Rivera, 2017). A análise molecular de *Cryptosporidium* spp. revelou que existe mais de 40 espécies em diferentes hospedeiros (Tabela 4) (Leoni *et al.*, 2007; Koloren e Ayaz, 2016). Estudos moleculares identificaram *C. parvum* e *C. hominis* como espécies responsáveis por infecções humanas (Koloren e Ayaz, 2016). No entanto, existem outras espécies de *Cryptosporidium* que podem infectar o homem, como *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium suis*, *Cryptosporidium muris* e *Cryptosporidium andersoni*, principalmente os imunocomprometidos (Ranjbar *et al.*, 2016).

A criptosporidiose é umas das doenças entéricas parasitárias mais comuns nos seres humanos, afetando países desenvolvidos e países em desenvolvimento (Leoni *et al.*, 2007). Os sintomas mais comuns são a diarreia, vômitos, náuseas e falta de apetite. Para além disso, também está associada ao baixo desenvolvimento cognitivo das crianças, devido à desnutrição. Nos indivíduos imunocomprometidos, indivíduos com HIV e pacientes com cancro, e em crianças com menos de 5 anos de idade podem ter sintomas crónicos e mais graves (Chalmers e Davies, 2010; Ryan *et al.*, 2017).

Embora qualquer pessoa possa desenvolver a doença, as pessoas com elevado risco de infeção como os hospedeiros imunodeprimidos, podendo sofrer danos mais severos causados pela desidratação grave devido ao aumento de diarreia, podendo levar à morte (Palos Ladeiro *et al.*, 2013). Em indivíduos saudáveis, os sintomas de infeção por *Cryptosporidium* geralmente persistem por uma a duas semanas (Schets *et al.*, 2007). Até à data, não existe uma terapia efetiva para pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (Palos Ladeiro *et al.*, 2013).

Tabela 4 – Espécies de *Cryptosporidium* e respetivos hospedeiros (Adaptada de Carmena, 2010).

| Espécies | Hospedeiros | Infeções em humanos | Surto de doenças transmitidas por água | Reportado na água (Condições sem surtos) |
|-----------------------|----------------------|----------------------------|---|---|
| <i>C. andersoni</i> | Gado bovino | Sim | Não | Sim |
| <i>C. baileyi</i> | Galinhas | Não | Não | Sim |
| <i>C. bovis</i> | Gado bovino | Não | Não | Não |
| <i>C. canis</i> | Cão | Sim | Não | Sim |
| <i>C. fayeri</i> | Canguru | Não | Não | Não |
| <i>C. felis</i> | Gato | Sim | Não | Sim |
| <i>C. fragile</i> | Sapo | Não | Não | Não |
| <i>C. galli</i> | Galinhas | Não | Não | Não |
| <i>C. hominis</i> | Humanos | Sim | Sim | Sim |
| <i>C. macropodum</i> | Canguru | Não | Não | Não |
| <i>C. meleagridis</i> | Perú | Sim | Sim | Sim |
| <i>C. molnari</i> | Peixe do mar | Não | Não | Não |
| <i>C. muris</i> | Rato | Sim | Não | Sim |
| <i>C. parvum</i> | Rato | Sim | Sim | Sim |
| <i>C. ryanae</i> | Gado bovino | Não | Não | Não |
| <i>C. scophthalmi</i> | Peixe de aquicultura | Não | Não | Não |
| <i>C. serpentis</i> | Cobra | Não | Não | Não |
| <i>C. suis</i> | Porco | Sim | Não | Sim |
| <i>C. varanii</i> | Lagarto | Não | Não | Não |
| <i>C. wrairi</i> | Porquinho da Índia | Não | Não | Não |

A criptosporidiose encontra-se distribuída por todo o mundo, podendo ser transmitida

através do contacto pessoa a pessoa, contacto com animais infetados, consumo de água e de alimentos (Ryan *et al.*, 2017) e através de águas recreativas (piscinas e jacuzzi) (Schets *et al.*, 2007).

Em 2011, a CDC considerou a criptosporidiose uma doença endémica nos EUA, estimando-se haver 748 123 casos por ano. De acordo com a CDC, *Cryptosporidium* é o parasita que está no topo de doenças infecciosas de origem parasitária em humanos nos EUA. Está estimado que a criptosporidiose deverá custar aos EUA 44 milhões de dólares/ano com 2 725 hospitalizações que poderão durar entre 5,8 a 9,3 dias tendo um custo médio de 16 203 dólares por hospitalização (Tei *et al.*, 2016).

As formas infetantes *Cryptosporidium* medem 4-5 μm (Figura 3) e são formas muito resistentes que sobrevivem no ambiente por vários meses e resistem aos tratamentos de água como a desinfeção com cloro (Ladeiro *et al.*, 2013; Ryan *et al.*, 2017).

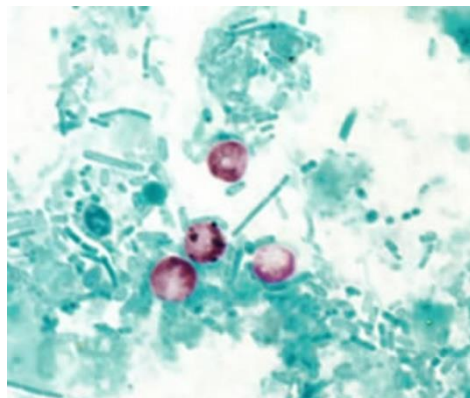


Figura 3 – Ooquistos de *Cryptosporidium* spp. em microscopia ótica após coloração de Ziehl-Neelsen modificada (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC) <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/diagnosis.html>).

O ciclo de vida de *Cryptosporidium* (Figura 4) começa pela ingestão de um ooquisto esporulado com 4 esporozoítos, que é excretado nas fezes ou, em situações pontuais pode aparecer em secreções respiratórias de um hospedeiro infetado. Após a ingestão do ooquisto ocorre o desenquistamento e os esporozoítos são libertados infetando as células epiteliais do trato gastrointestinal e/ou do trato respiratório. Nestas células ocorre a multiplicação assexuada (esquizogonia e merogonia) e posteriormente a multiplicação sexuada (gametogénese), produzindo microgâmetas e macrogâmetas. Depois de ocorrer a singamia, desenvolvem-se os ooquistos esporulados que são expulsos nas fezes (CDC, 2016).

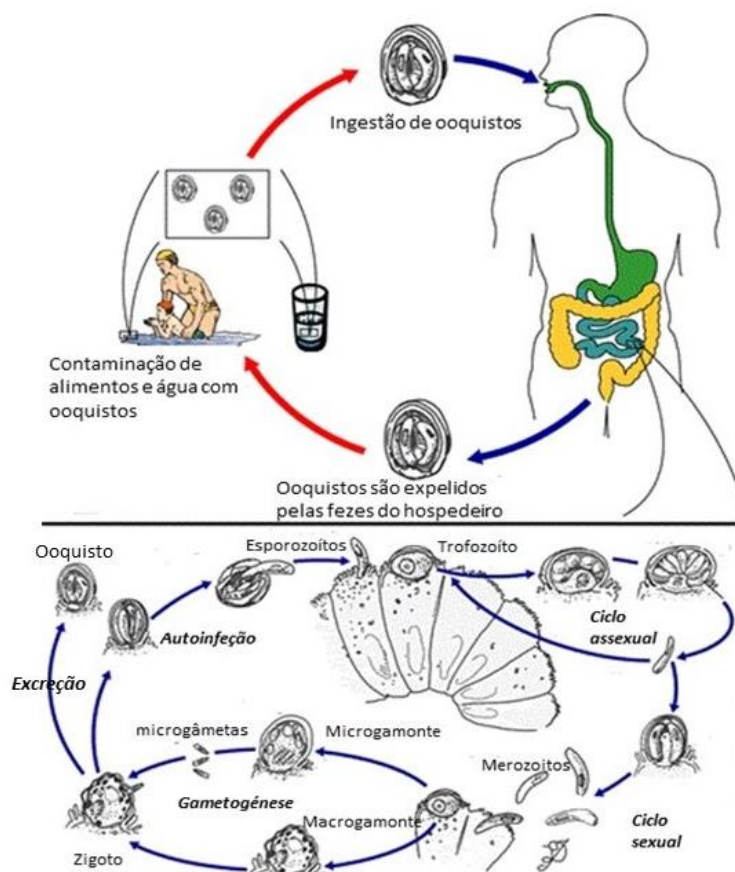


Figura 4 – Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. – Ingestão de oocistos pela água ou alimentos e desenquistamento dos oocistos no intestino. Multiplicação sexuada e assexuada, desenvolvendo-se oocistos esporulados que saem nas fezes (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC) <https://www.cdc.gov/parasites/crypto/pathogen.html>).

O hospedeiro pode ser infetado facilmente por água contaminada com oocistos infetantes ou por alimentos que foram lavados por água contaminada. Uma das maiores ocorrências de criptosporidiose foi em 1993 em Milwaukee, onde 400 000 pessoas foram infetadas devido ao abastecimento público de água contaminada. Globalmente, existem relatos de criptosporidiose por transmissão hídrica e nalguns países é uma doença de notificação obrigatória (Rehn *et al.*, 2015).

Existe uma associação entre o aumento de giardíase e criptosporidiose com o aumento da temperatura e precipitação nalgumas zonas, especialmente em climas tropicais. A ocorrência de precipitação intensa e subsequente escoamento é responsável pelo aumento dos casos de infeção por via hídrica (Selstad *et al.*, 2015).

Giardíase e criptosporidiose são essencialmente doenças transmitidas pela água sendo consideradas um problema de saúde pública. Não havendo muitos trabalhos realizados sobre a deteção de *Giardia* e *Cryptosporidium* em moluscos bivalves em Portugal, propõe-se no presente trabalho a pesquisa destes dois parasitas de forma a avaliar o risco associado ao consumo deste alimento.

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos

Este estudo teve como objetivos detetar e caracterizar os protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em moluscos bivalves, nomeadamente em amostras de ostras das espécies *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* e *Crassostrea angulata*.

Tendo em vista o objetivo principal, o plano de trabalho desenvolvido foi:

- Detecção de *G. lamblia* em amostras de ostras por técnicas de biologia molecular, nested-PCR e qPCR;
- Detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras de ostras por técnicas de biologia molecular, nested-PCR e qPCR;
- Caracterização das espécies e genótipos de *G. lamblia* por sequenciação do ADN;
- Caracterização das espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. por sequenciação do ADN.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

Os estádios infecciosos de *Cryptosporidium* e *Giardia*, quistos e ooquistos respetivamente, são muito resistentes no meio ambiente, particularmente na água, causando surtos em todo o mundo devido ao consumo de alimentos e água contaminados por estes protozoários.

Devido à dificuldade na deteção destes dois protozoários, a biologia molecular tem desenvolvido métodos para melhorar a identificação e diferenciação de espécies, baseadas na técnica de PCR, melhorando a segurança da água e alimentos e consequentemente a segurança da saúde pública (Marangi *et al.*, 2015).

3.1. Caracterização das amostras de moluscos bivalves

As amostras de ADN de ostras foram cedidas pelo Doutor Francisco Ruano do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA).

O ADN de 190 amostras foi extraído de três espécies diferentes de ostras, nomeadamente *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* e *Crassostrea angulata*, durante os anos de 2011 a 2017 em vários locais de Portugal (Tabela 5).

Tabela 5 – Identificação e caracterização das amostras dos moluscos bivalves.

| Espécie | Origem | Mês/Ano de recolha | Número de amostras |
|--|------------------------|------------------------|--------------------|
| <i>Ostrea edulis</i> (n=44) | Rio Lima | Maio 2011 | 24 |
| | Ria Formosa (Bivalvia) | Julho 2015 | 12 |
| | Importada (Ostradamus) | Junho 2015 | 8 |
| <i>Crassostrea gigas</i> (n=109) | Alvor | Outubro 2015 | 25 |
| | Olhão | Novembro 2015 | 5 |
| | Alvor | Dezembro 2015 | 25 |
| | Alvor | Junho 2016 | 12 |
| | Alvor (Viveiro Pardal) | Julho 2016 | 12 |
| <i>Crassostrea angulata</i> (n=37) | Aveiro | Março 2016 | 30 |
| | Alvor | Maio 2016 | 12 |
| | Mira | Agosto e Setembro 2017 | 25 |
| Total | | | 190 |

3.2. Extração de ADN

Para extração de ADN utilizou-se as brânquias das ostras e recorreu-se ao kit comercial “*DNeasy Blood & Tissue*” (Qiagen).

Colocou-se num tubo de centrifuga de 1,5 mL cerca de 25 mg de tecido das brânquias dos bivalves, 180 µL de tampão ATL e 20 µL de proteinase K. No vortex, agitou-se a mistura e incubou-se num banho a 56°C até à lise completa dos tecidos (1h-3h). Ao longo da incubação, agitou-se a mistura algumas vezes no vortex. Após a incubação, adicionou-se 200 µL de tampão AL e agitou-se no vortex durante 15 segundos. Posteriormente adicionou-se 200 µL etanol (96-100%) e agitou-se novamente no vortex durante 15 segundos.

O lisado foi transferido para uma coluna *DNeasy Mini Spin* e colocada num tubo coletor de 2 mL e centrifugada a 6000g (8000 rpm) durante 1 minuto. 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 AW1 e centrifugou-se durante 1 minuto a 6000g (8000 rpm). O tubo coletor contendo o filtrado foi novamente descartado. A coluna foi colocada num novo tubo, adicionou-se 500 µL de tampão AW2 e centrifugou a 20 000g (14 000 rpm) durante 3 minutos, para assim secar a membrana *DNeasy*. Descartou-se novamente o tubo coletor e colocou-se a coluna para um novo tubo de 2mL.

Na última fase de eluição, adicionou-se 200 µL de tampão AE diretamente sobre a membrana e incubou-se a temperatura ambiente durante 1 minuto. Subsequentemente, centrifugou-se a 6000g (8000 rpm) durante 1 minuto. A coluna foi descartada e a solução eluída de ADN foi armazenada a -20°C num tubo de 1,5 mL devidamente etiquetado.

3.3. Amplificação dos marcadores genéticos de *Cryptosporidium* por nested-PCR

As amostras de ADN genómico foram submetidas à amplificação do gene 18S rRNA (*ssu* rRNA) de *Cryptosporidium* spp. por nested-PCR (Xiao *et al.*, 1999). Na primeira reação de PCR obtém-se o fragmento de aproximadamente 1.325pb usando o oligonucleótido senso 5'-TTCATGAGCTAATACATGCG-3' (Crypto 18SF1) e o oligonucleótido anti-senso 5'-CCCATTTCTTCGAAACAGGA-3' (Crypto 18SR1). Na segunda reação de PCR forma-se um fragmento de aproximadamente 825pb, utilizando-se o oligonucleótido senso 5'-GGAAGGGTTGATTTATTAGATAAAG-3' (Crypto 18SF2) e o oligonucleótido anti-senso 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' (Crypto 18SR2).

As duas reações de PCR foram realizadas num volume final de 20 µL, contendo 10 µL de *DFS Mastermix* (Bioron), 1 µL de cada oligonucleótido (10 µM), 3 µL de albumina de soro bovino (BSA) e 5 µL de ADN extraído na primeira reação ou 1 µL do produto amplificado na segunda reação. A água estéril MiliQ foi utilizada para perfazer o volume final (Tabela 6).

As reações de PCR foram realizadas no termociclador *Biorad* de acordo com as seguintes condições:

- Primeira reação: 94°C/3minutos (desnaturação inicial), seguido de 35 ciclos de 95°C/45s (desnaturação), 59°C/45s (ligação) e 72°C/60s (extensão) e uma extensão final de 72°C/7minutos.
- Segunda reação: 94°C/3min (desnaturação inicial), seguido de 35 ciclos de 95°C/30s (desnaturação), 59°C/90s (ligação) e 72°C/60s (extensão) e uma extensão final de 72°C/7minutos.

As amostras foram realizadas em duplicado e foram incluídos conjuntamente com as amostras um controlo positivo (INI Crypto) e um controlo negativo (água). O isolado de *Cryptosporidium* foi cedido pelo Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

Tabela 6 – Composição da mistura usada nas reações de nested-PCR para amplificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia*.

| Reagentes de reação (Quantidade em µL) | <i>Cryptosporidium</i> spp. | | <i>Giardia lamblia</i> | |
|---|-----------------------------|-----------|------------------------|-----------|
| | 1ª reação | 2ª reação | 1ª reação | 2ª reação |
| Amostra de ADN | 5 | 1 | 5 | 1 |
| <i>DFS Mastermix</i> | 10 | 10 | - | - |
| <i>Mix Plus</i> (BioLabs) | | | 12,5 | 12,5 |
| Oligonucleótidos | | | | |
| - Senso | 1 | 1 | 1,25 | 1,25 |
| - Anti-senso | 1 | 1 | 1,25 | 1,25 |
| BSA | 3 | 3 | - | - |
| DMSO | - | - | 1,25 | 1,25 |
| MgCl ₂ | - | - | 0,5 | 0,5 |
| Água MilliQ | - | 4 | 3,25 | 7,25 |
| Volume final | 20 | 20 | 25 | 25 |

3.4. Amplificação dos marcadores genéticos de *Giardia* por nested-PCR

As amostras de ADN genómico foram submetidas à amplificação do gene *rRNA 16S* (*ssu rRNA*) de *Giardia* (Hopkins *et al.*, 1997; Appelbee *et al.*, 2003).

Na primeira reação de PCR obtém-se o fragmento de 497pb usando-se os oligonucleótidos Gia2029 (5'- AAGTGTGGTGCAGACGGACTC-3') e Gia2150c (5'- CTGCTGCCGTCCTTGGATGT-3'). Na segunda reação de PCR utilizam-se os oligonucleótidos RH11 (5'- CATCCGGTCGATCCTGCC -3') e RH4 (5'- AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG-3') obtendo-se o fragmento de 292pb.

As duas reações de PCR foram realizadas para um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de *Mix Plus* (BioLabs), 1,25 µL de cada oligonucleótido (10 µM), 1,25 µL de dimetilsufóxido (DMSO), 0,5 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) (25mM) e 5 µL de ADN extraído na primeira reação ou 1 µL do produto amplificado na segunda reação. A água estéril MiliQ foi utilizada para perfazer o volume final (Tabela 6).

As reações de PCR foram realizadas no termociclador *Biometra Tpersonal* de acordo com as seguintes condições:

- Primeira reação 96°C/2minutos (desnaturação inicial), seguido de 35 ciclos de 96°C/45s (desnaturação), 58°C/30s (ligação) e 72°C/45s (extensão) e uma extensão final de 72°C/4minutos.
- Segunda reação: 96°C/2minutos (desnaturação inicial), seguido de 35 ciclos de 96°C/45s (desnaturação), 55°C/30s (ligação) e 72°C/45s (extensão) e uma extensão final de 72°C/4minutos.

As reações foram realizadas em duplicado e foram incluídos conjuntamente com as amostras, um controlo positivo (ADN de *Giardia lamblia* WBC6) e um controlo negativo (água). A estirpe de referência WBC6 foi adquirida à *American Type Culture Collection* (Rockville, MD).

3.5. Visualização dos fragmentos de ADN amplificados

Os produtos amplificados no nested-PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose. Para tal, foram adicionados 3 µL de solução aquosa de azul bromofenol a 15 µL dos produtos amplificados e aplicou-se esta mistura nos poços do gel de agarose a 2% (tampão Tris base ácido bórico e EDTA com brometo de etídio). Para a identificação do tamanho dos fragmentos de ADN amplificados foi utilizado um padrão de ADN (Nzy Ladder VI, Nzytech).

As migrações electroforéticas foram realizadas a 90V durante aproximadamente 60 min em tampão de corrida TBE 1%. O gel foi visualizado e fotografado (Uvitec, Uvisave) sobre luz ultravioleta, num transluminador (Vilbert Lourmat).

3.6.PCR em tempo real (qPCR)

3.6.1 *Cryptosporidium* spp.

As amostras de ADN genómico foram submetidas à amplificação do gene 18S rDNA de *Cryptosporidium* spp. por qPCR, conforme descrito previamente (Lalonde e Gajadhar, 2011). Os oligonucleótidos utilizados para a amplificação do fragmento 315pb foram Crypto F (5'-AGTGACAAGAAATAACAATACAGG-3') e Crypto R (5'-CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC - 3'), com um *melting peak* de 82°C.

As reações de qPCR foram realizadas para um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de *EvaGreen* (A&A Biotechnology), 1 µL de cada oligonucleótido (10 µM), 2 µL de ADN extraído e 8,5 µL de água MiliQ estéril (Tabela 7).

As reações de qPCR foram realizadas nas seguintes condições: 98°C/2min (desnaturação inicial), seguido de 40 ciclos de 98°C/5s (desnaturação) e 59°C/5s (ligação). Para obtenção da curva de *melting*, no final de cada reação houve um aumento de temperatura de 5°C até atingir os 95°C, obtendo-se um sinal de fluorescência em cada aumento de temperatura.

As reações foram feitas em duplicado e foram incluídos controlo positivo (INI Crypto) e controlo negativo (água). O isolado de *Cryptosporidium* foi cedido por INI/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

O qPCR foi realizado no termociclador *CFX96 Real-Time System C1000* (Bio-Rad Laboratories) e os resultados foram analisados através do programa *Bio-Rad CFX Manager* (Bio-Rad Laboratories).

Tabela 7 – Composição da mistura usada nas reações de qPCR para amplificação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia*.

| Reagentes | Volume (µl) | |
|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| | <i>Cryptosporidium</i> spp. | <i>G. lamblia</i> |
| ADN (amostra) | 1 | 2 |
| <i>EvaGreen</i> (A&A Biotechnology) | 12,5 | 12,5 |
| Oligonucleótido senso (10 µM) | 1 | 1 |
| Oligonucleótido anti-senso (10 µM) | 1 | 1 |
| Água MiliQ estéril | 9,5 | 8,5 |
| Volume final | 25 | 25 |

3.6.2 *Giardia lamblia*

As amostras de ADN genómico foram submetidas à amplificação do gene cadeia aberta de C4 (*orfC4*) de *Giardia lamblia* por qPCR (Almeida *et al*, 2010a).

Para a amplificação do fragmento 103pb do gene *orfC4*, utilizaram-se os oligonucleótidos *orfC4A_F* (5'- CTGTAGACAGGGCCCAGGCC -3') e *orfC4A_R* (5'- ATGATGTCCCCTGCCCTTAAT - 3'), específicos para genótipo A, com um *melting peak* de 85°C. Para a amplificação do fragmento 171pb do gene *orfC4*, utilizaram-se os oligonucleótidos *orfC4B_F* (5'- ACTGTCCATTCTATCTGAG - 3') e *orfC4B_R* (5' - GGATTCCATTGGCCTCCACCT - 3'), específicos para genótipo B, com um *melting peak* de 79°C.

As reações de PCR foram realizadas a um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de *EvaGreen* (A&A Biotechnology), 1 µL de cada oligonucleótido, 1 µL de ADN extraído e 9,5 µL de água MiliQ estéril (Tabela 7).

As reações de qPCR foram realizadas nas seguintes condições: 98°C/2min (desnaturação inicial), seguido de 40 ciclos de 98°C/5s (desnaturação) e 59°C/5s (ligação). Para obtenção da curva de *melting*, no final de cada reação houve um aumento de temperatura de 5°C até atingir os 95°C, obtendo-se um sinal de fluorescência em cada aumento de temperatura.

As reações foram feitas em duplicado e foram incluídos controlos: controlo positivo do genótipo A (ADN de *Giardia lamblia* WBC6), genótipo B (INI 27) e controlos negativos (água). O isolado INI 27 foi cedido por INI/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

O qPCR foi realizado no termociclador *CFX96 Real-Time System C1000* (Bio-Rad Laboratories) e os resultados foram obtidos através do programa *Bio-Rad CFX Manager* (Bio-Rad Laboratories).

3.7. Sequenciação

Os produtos amplificados da segunda reação do nested-PCR foram purificados utilizando o *kit ExoSAP-IT™* (ThermoFischer Scientific), segundo as instruções do fabricante.

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

Capítulo 4

Resultados

4. Resultados

As amostras das ostras foram sujeitas a técnicas de biologia molecular, nested-PCR e qPCR para deteção dos protozoários *Cryptosporidium* e *G. lamblia*.

4.1. Deteção de *Cryptosporidium* spp. por nested-PCR e qPCR

O nested-PCR descrito por Xiao *et al.* (1999) amplificou fragmentos de 825 pb do gene *ssu rRNA* de *Cryptosporidium* spp. na amostra controlo (C+, positivo) (Figura 5).

Das 190 amostras, obtiveram-se 17 (8,95%) foram considerados potencialmente positivas (Figura 5, Tabela 8) uma vez que foram observados amplicões ténues com tamanhos muito próximos a 825 pb.

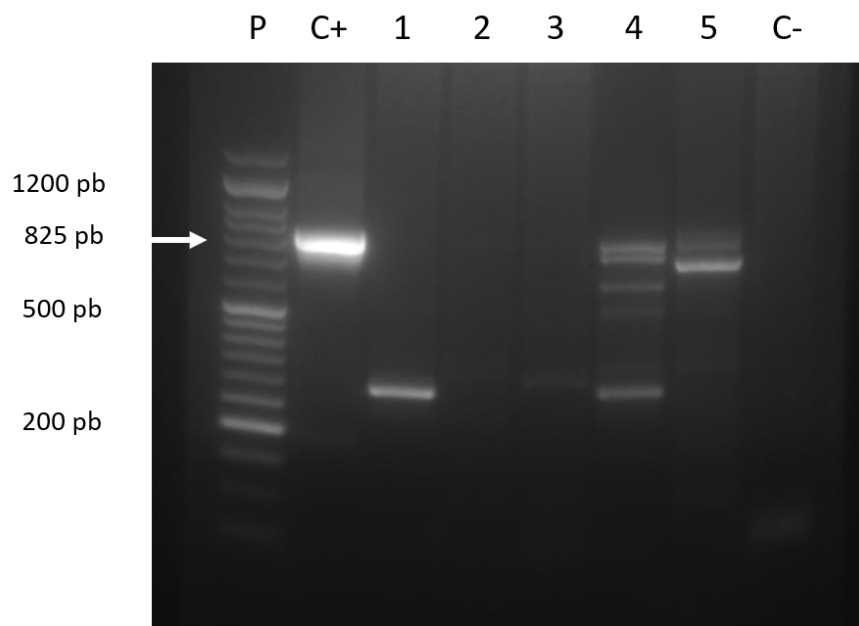


Figura 5 – Electroforese em gel de agarose a 2% e coloração com brometo de etídeo de amplicões do nested-PCR do gene *ssu rRNA* de *Cryptosporidium* spp.. Os fragmentos 825pb foram amplificados com os oligonucleótidos Crypto18F1, Crypto18R1, Crypto18F2 e Crypto18R2. P: marcador de massa molecular NZY Ladder VI (Nzytech); C+, controlo positivo; C-, controlo negativo, 1-5: amostras de *Crassostrea angulata* de Mira.

Tabela 8 – Detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras de moluscos bivalves por nested-PCR e qPCR.

| Espécie (moluscos) | Origem | Mês/Ano de recolha | Amostras positivas (n°) | |
|-----------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|------|
| | | | Nested-PCR | qPCR |
| <i>C. angulata</i> | Alvor | Maio, 2016 | 4 | 0 |
| <i>C. angulata</i> | Mira | Agosto e Setembro 2017 | 10 | 0 |
| <i>C. gigas</i> | Alvor (Viveiro Pardal) | Julho, 2016 | 2 | 0 |
| <i>C. gigas</i> | Aveiro | Março, 2016 | 1 | 0 |

Das 17 amostras consideradas positivas, foram selecionadas 9 amostras com maiores quantidades de amplificação para deteção do gene *18S rDNA* de *Cryptosporidium* spp. por qPCR.

Nestas 9 amostras não houve amplificações específicas, uma vez que o *cycle quantification* (Cq) é elevado e as curvas de *melting* não coincidem (temperatura de *melting* de 70 °C) com as do controlo de *Cryptosporidium* (temperatura de *melting* de 80°C).

Na Figura 6 observam-se os resultados obtidos do qPCR de três amostras exemplificativas, Alvor 11 e 12 e VP 11, com curvas de amplificação (Figura 6 A) e curvas de *melting* (Figura 6B).

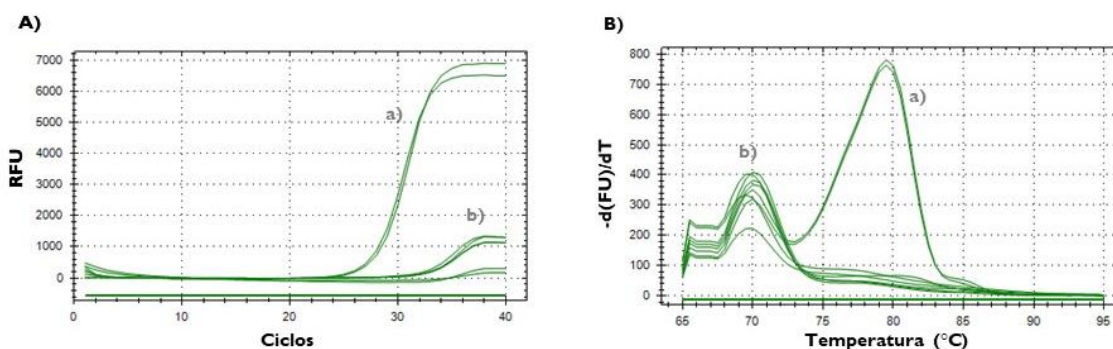


Figura 6 – Curvas de amplificação (A) e curvas de *melting* (B) do qPCR do gene *18S rDNA* de *Cryptosporidium* spp.: a) controlos positivos de *Cryptosporidium* spp.; b) amostras Alvor 11 e 12 e VP 11.

4.2. Detecção de *G. lamblia* por nested-PCR e qPCR

O nested-PCR descrito por Appelbee *et al.* (2003) e Hopkins *et al.* (1997) amplificou fragmentos de 292pb do gene *ssu rRNA* de *G. lamblia* na amostra controlo de *Giardia* (C+, positivo).

Das 190 amostras em estudo, obtiveram-se resultados positivos em 29 amostras (15,3%) (Tabela 9). Os resultados apresentados na figura 7 são exemplificativos de algumas amostras que amplificaram o fragmento de 292pb do gene *ssu rRNA*.

Tabela 9 – Detecção de *Giardia lamblia* em amostras de moluscos bivalves por nested-PCR do gene *ssu rRNA*.

| Espécie | Origem | Mês/Ano de recolha | Amostras positivas (n°) |
|--------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| <i>C. angulata</i> | Alvor | Maio 2016 | 4 |
| <i>C. angulata</i> | Mira | Agosto e Setembro 2017 | 9 |
| <i>C. gigas</i> | Alvor (Viveiro Parda) | Julho 2016 | 4 |
| <i>C. gigas</i> | Alvor | Outubro 2015 | 2 |
| <i>C. gigas</i> | Alvor | Junho 2016 | 1 |
| <i>O. edulis</i> | Rio Lima | Maio 2011 | 7 |
| <i>O. edulis</i> | Ria Formosa (Bivalvia) | Julho 2015 | 2 |
| Total | | | 29 |

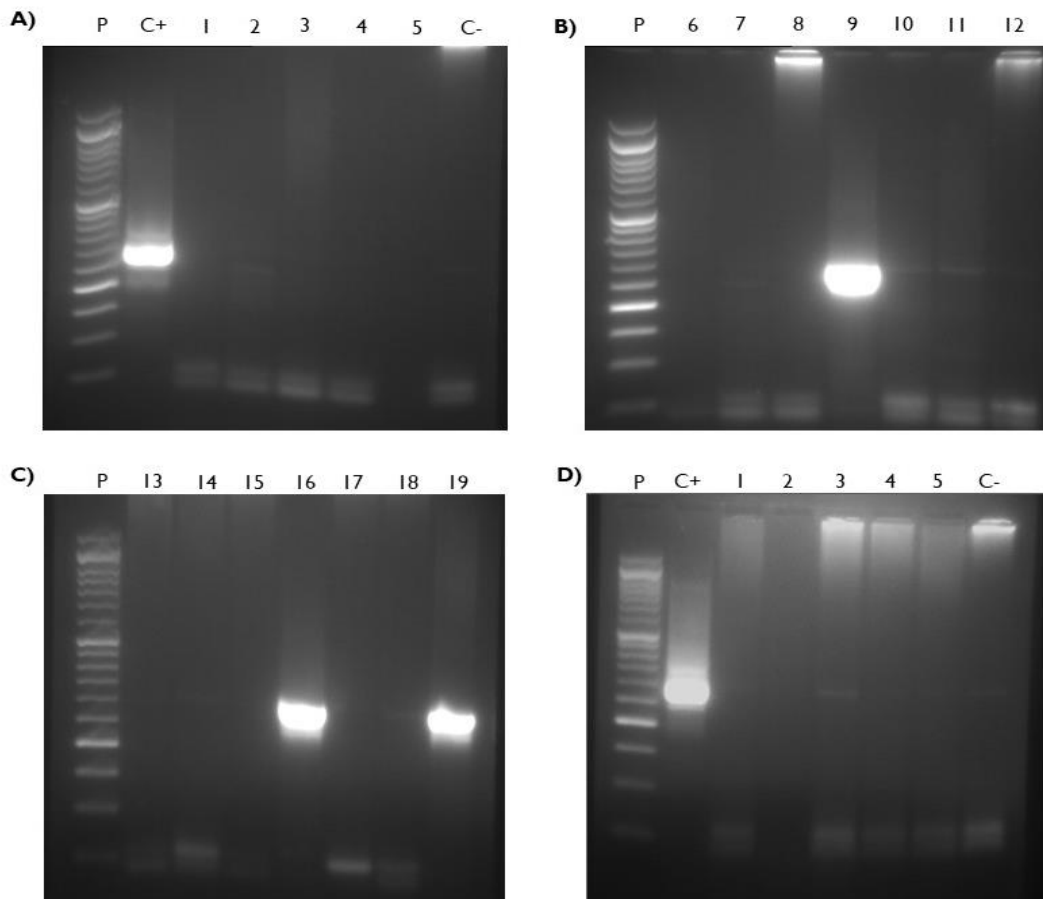


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose a 2% e coloração com brometo de etídio de amplificações do nested-PCR do gene *ssu rRNA* de *Giardia lamblia*. Os fragmentos de 292pb foram amplificados pelos oligonucleótidos Gia2029, Gia2150c, RH11 e RH4. P: marcador de massa molecular NZY *Ladder VI* (Nzytech), C+: Controlo positivo (WBC6), C-: Controlo negativo, A), B) e C) 1-19: amostras de *O.edulis* recolhidas de Rio Lima-Maio 2011, D) 1-5: amostras *C. gigas* recolhidas de Alvor-Viveiro Pardal-Julho 2016.

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

O fragmento de ADN do gene *orfC4* (*melting peak* de 86°C) foi amplificado nas amostras do genótipo A (WBC6) e o fragmento de ADN do gene *orfC4* (*melting peak* de 82°C) foi amplificado na amostra do genótipo B (INI27) (Figura 8).

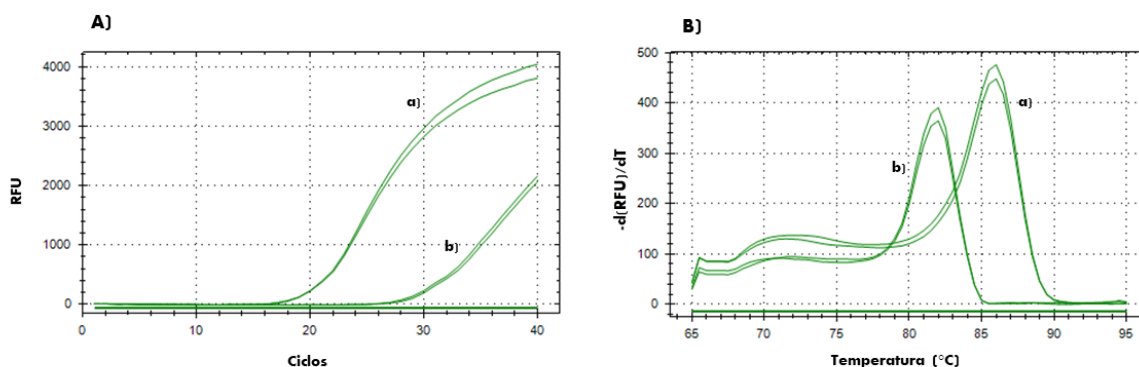


Figura 8 – Curvas de amplificação (A) e curvas de melting (B) do qPCR do gene *orfC4* dos genótipos A (a) e B (b) de *Giardia lamblia*.

Das 29 amostras, 28 amplificaram o gene *orfC4* do genótipo A (Ct entre 25 e 34). Contudo, o *melting peak* destas 28 amostras está alterado (80°C). Nenhuma amostra amplificou para o gene *orfC4* do genótipo B.

Na Figura 9 observa-se as curvas de amplificação e de *melting* de 7 amostras representativas.

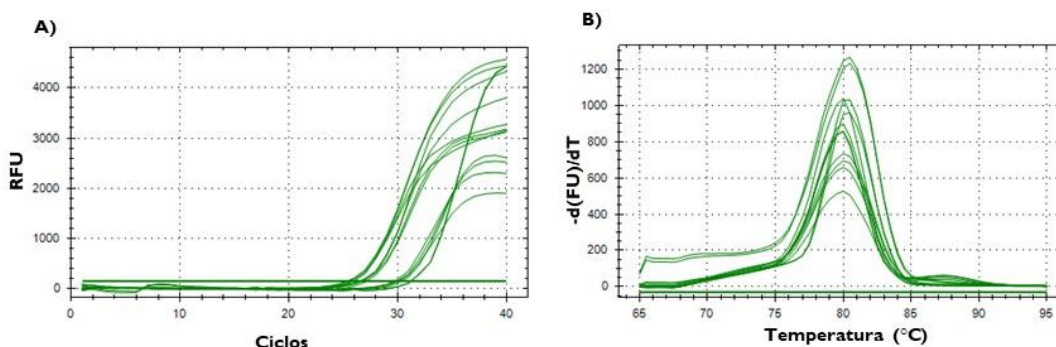


Figura 9 – Curvas de amplificação (A) e curvas de melting (B) do qPCR do gene *orfC4* de *Giardia lamblia* genótipo A: Amostras RioL 9, RioL 16, RioL 19, RioL 21, RioL 24, AlvorOut 35 e RioF 6.

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

Das 29 amostras positivas na amplificação do gene *ssu rRNA* de *Giardia* foram selecionadas 21 amostras para a sequenciação. Foram escolhidas essas amostras por possuírem melhores resultados no nested-PCR, isto é, apresentação de bandas mais nítidas na eletroforese. Não foi realizado o sequenciamento nas amostras potencialmente positivas para *Cryptosporidium*, uma vez que o resultado do qPCR foi negativo.

Das 21 amostras, 12 foram sequenciadas com sucesso. O alinhamento das sequências do fragmento 292bp do gene *ssu rRNA* de *Giardia* mostrou que 10 amostras apresentam 100%

de homologia com as sequências referências (M54878 e AF199446) (Figura 10) e duas amostras apresentam 99% de homologia com as sequências referências (M54878 e AF113901) (Tabela 10).

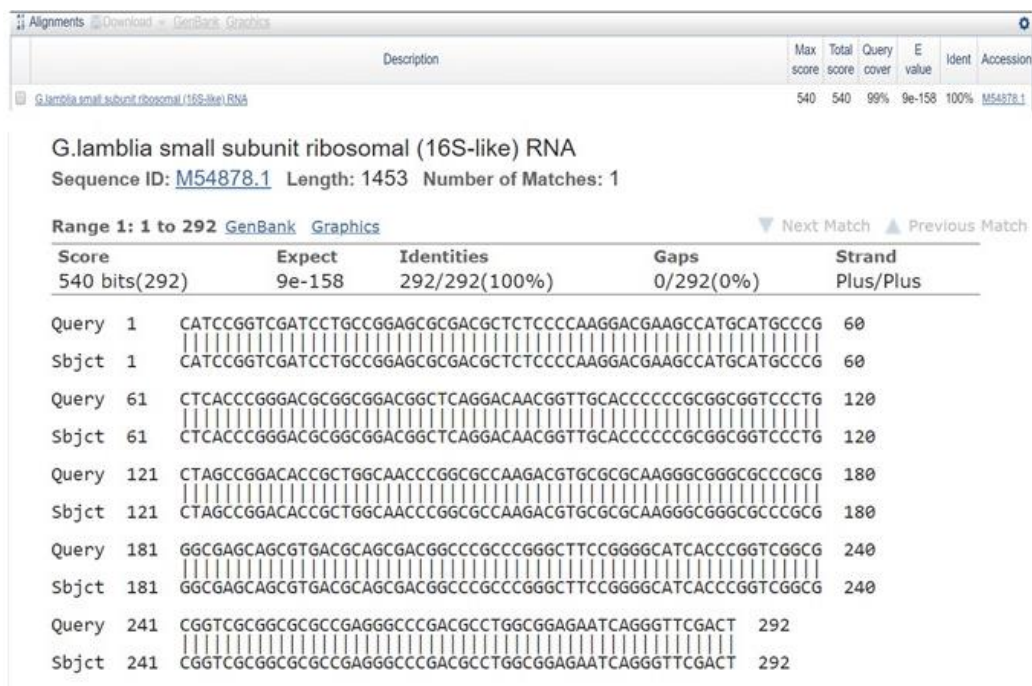


Figura 10 – Alinhamento múltiplo de fragmentos das sequências do gene *ssu rRNA* de *Giardia lamblia* da amostra RioL 24. O programa BLAST foi utilizado para comparar as sequências nucleotídicas disponíveis no *GenBank* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabela 10 – Homologia das sequências do gene *ssu rRNA* de *Giardia* das amostras de ostras em estudo com as disponíveis no *GenBank*.

| Amostras* | Homologia |
|---------------------------|-------------------|
| Rio L - 9, 16, 19, 21, 24 | |
| Alvor Maio 10 | 100% |
| Alvor Out 35 | <i>G. lamblia</i> |
| Alvor Dez 6 | M54878 e AF199446 |
| Mira - 11, 13 | |
| | 99% |
| Rio F 6 | <i>G. lamblia</i> |
| Mira 12 | M54878 e AF113901 |

*Rio F – *O. edulis* de Ria Formosa (Bivalvia), Julho 2015
 Rio L – *O. edulis* de Rio Lima, Maio 2011
 Alvor Out – *C. gigas* de Alvor, Outubro 2015
 Alvor Dez – *C. gigas* de Alvor, Dezembro 2015
 Alvor Maio – *C. angulata* de Alvor, Maio 2016
 Mira – *C. angulata* de Mira, Agosto e Setembro 2017

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

Tabela II – Diferenciação dos genótipos de *G. 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 |
| A | G | C | G | A | G | - | T | C | A |
| B | A | T | C | A | A | C | G | G | A |
| C | A | T | C | A | A | C | A | G | A |
| D | A | T | C | A | A | C | A | A | A |
| E | G | C | G | A | G | - | T | C | G |
| F | G | C | G | C | G | - | T | C | A |
| G | 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.

Das 12 amostras sequenciadas foi possível genotipar 10, todas pertencentes ao genótipo A e 2 que poderão ser genótipo A ou F (Tabela 12).

Tabela 12 – Genotipagem de *Giardia lamblia* com base nas posições nucleotídicas do gene *ssu rRNA*.

| Amostra | Posição | | | | | | | | | Genótipo |
|--------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----------|
| | 22 | 23 | 24 | 38 | 44 | 45 | 63 | 73 | 93 | |
| RioF6 | - | - | - | - | - | - | - | C | A | A/F |
| RioL9 | G | C | G | A | G | - | T | C | A | A |
| RioL16 | G | C | G | A | G | - | T | C | A | A |
| RioL19 | G | C | G | A | G | - | T | C | A | A |
| RioL21 | G | C | G | A | G | - | T | C | A | A |
| RioL24 | G | C | G | A | G | - | T | C | A | A |
| Alvor Maio10 | G | C | G | A | G | - | T | C | A | A |
| Alvor Out 35 | G | C | G | A | G | - | T | C | A | A |
| Alvor Dez 6 | G | C | G | A | G | - | T | C | A | A |
| Mira11 | G | C | G | A | G | - | T | C | A | A |
| Mira12 | - | - | - | - | - | - | - | C | A | A/F |
| Mira13 | G | C | G | A | G | - | T | C | A | A |

Capítulo 5

Discussão

5. Discussão

A segurança alimentar tem-se tornado cada vez mais importante relativamente à saúde pública, uma vez que existem diversas doenças transmitidas por alimentos, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (Velusamy *et al.*, 2010).

As doenças transmitidas por alimentos afetam diversos grupos da população, em especial os idosos e as crianças, que são considerados grupos de risco. Assim, para diminuir o impacto e prevenir essas infeções, deve-se melhorar a monitorização e deteção dos agentes patogénicos transmitidos pelos alimentos (Adamu *et al.*, 2014).

Ao longo dos anos têm sido referenciados surtos alimentares associados ao consumo de marisco, mexilhão e ostras (Leal e Franco, 2008). Os moluscos bivalves são produzidos em ecossistemas aquáticos que estão sujeitos a descargas de esgotos sem tratamentos, existindo uma grande probabilidade de serem contaminados pelos resíduos fecais presentes nas águas (Leal e Franco, 2008). Os moluscos bivalves são considerados bioindicadores de poluição devido a sua capacidade de filtração, acumulando bactérias, protozoários e vírus nas brânquias e no trato intestinal (Adell *et al.*, 2014). Como é um alimento bastante apreciado nos países mediterrânicos, o consumo dos moluscos crus ou pouco cozinhados pode, assim, estar na origem de surtos alimentares (Souza *et al.*, 2012).

Os protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* conseguem disseminar-se facilmente no ambiente a partir de descargas de resíduos (fezes) que contaminam recursos hídricos (Adell *et al.*, 2014) e vários estudos realizados em diferentes partes do mundo têm detetado estes parasitas em moluscos bivalves. No Quebec (Canadá), a análise de mexilhões azuis (*Mytilus edulis*) mostrou que 18% das amostras estavam contaminadas com *G. lamblia* e 73% com *Cryptosporidium* spp. (Lévesque *et al.*, 2010). Na costa Atlântica dos EUA, foi observada a contaminação de moluscos (ostras e/ou amêijoas) com *Cryptosporidium* (Fayer *et al.*, 2003; Graczyk *et al.*, 2007).

Resultados similares foram encontrados na Europa (Melo *et al.*, 2006; Gómez-Couso *et al.*, 2004; Freire-Santos *et al.*, 2000). Em Portugal, Melo e colaboradores (2006) observaram uma prevalência de 33% de *Cryptosporidium* spp. em amêijoas provenientes do Rio Guadiana. Em Espanha (costa da Galiza), quistos de *Giardia* foram encontrados em mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) nos estuários estudados, com uma taxa geral de contaminação de 41,5% (Gómez-Couso *et al.*, 2005).

Uma vez que a giardíase e a criptosporidiose são parasitoses transmitidas por água e alimentos e como existem poucos trabalhos sobre *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em

moluscos bivalves em Portugal, o presente trabalho teve como objetivo a detecção destes dois protozoários e a avaliação de risco associado ao consumo deste alimento.

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

A detecção de *G. lamblia* foi realizada através da amplificação do gene *ssu rRNA* por nested-PCR (Thompson e Ash, 2016). Obteve-se a amplificação em 29 amostras de diferentes origens (Rio Lima, Alvor e Mira), ocorrendo uma maior incidência nas amostras obtidas do Rio Lima. As mesmas amostras foram analisadas por qPCR com os oligonucleótidos do gene *orfC4* específicos para os genótipos A e B de *G. lamblia*. O genótipo A foi identificado em 28 amostras (97%), com valores do *threshold cycle* (Ct) a variarem entre Ct 25 e Ct34.

O amplicão de 292pb obtido pelo nested-PCR de 21 amostras foi purificado e sequenciado, tendo-se conseguido a identificação de *G. lamblia* genótipo A em 12 amostras: 10 amostras apresentam 100% de identidade com as estirpes de referência M54878 e AF199446 e duas amostras apresentam 99% de homologia.

Relativamente à detecção do gene *ssu rRNA* de *Cryptosporidium* spp. por nested-PCR, foram observados amplicões de baixa intensidade em 17 amostras e inicialmente estas amostras foram consideradas potencialmente positivas uma vez que os amplicões foram característicos de *Cryptosporidium ssu rRNA* (825pb). Posteriormente, procedeu-se à detecção do gene *18S rDNA* por qPCR, porém não ocorreu a amplificação do ADN em nenhuma amostra e, assim, atendendo à especificidade e sensibilidade do método qPCR consideram-se negativas para *Cryptosporidium* spp..

A detecção do genótipo A de *G. lamblia* nas amostras de moluscos bivalves é potencialmente preocupante devido a ser um genótipo associado a infeções no homem a nível mundial (Berrilli *et al.*, 2004; Hohweyer *et al.*, 2013). Salienta-se, contudo, que o presente trabalho não avaliou a viabilidade dos quistos de *G. lamblia* mas a sua detecção indica que existe contaminação fecal nas águas utilizadas para a produção dos moluscos bivalves, podendo representar um problema de saúde pública. Assim como a não detecção molecular de *Cryptosporidium* spp. nas amostras dos moluscos bivalves não indica que não existisse este parasita nas amostras.

Em estudos realizados em diferentes bacias hidrográficas e fontes de água potável do Estado de São Paulo (Brasil) foram observados uma maior prevalência do protozoário *Giardia*, comparativamente com *Cryptosporidium* (Araújo *et al.*, 2018; Razzolini *et al.*, 2010; Sato *et al.*,

2013). Com base nestes dados, Sato e colaboradores (2013) concluíram que a probabilidade de infecção por *Cryptosporidium* foi menor que a de *Giardia*. Resultados similares foram observados em um estudo conduzido em estações de tratamento de água localizados em Aragão (Espanha) (Ramo et al., 2017) com uma prevalência de 55% para *Cryptosporidium* e 70% para *Giardia*. A maior prevalência de *Giardia* em relação ao *Cryptosporidium* é frequentemente relatada em outros países, como por exemplo: França (Mons et al., 2009) Finlândia (Hörman et al., 2004) e Luxemburgo (Burnet et al., 2014).

Vários estudos realizados em Portugal mostraram que *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* circulam no homem, nos animais e no ambiente (Ferreira et al., 2013; Ferreira et al., 2017; Júlio et al., 2012a; Júlio et al., 2012b; Lobo et al., 2009). No norte do país foi identificado o genótipo A (subtipo A2) e o genótipo B de *G. lamblia* em amostras de água (Almeida et al., 2010b). No estudo realizado por Sousa e colegas (2006), nas regiões centro e norte de Portugal, foi possível detetar o genótipo A em amostras provenientes de indivíduos que apresentaram queixas gastrointestinais. Em 2013, um estudo conduzido em pré-escolas de Lisboa detetou quistos de *G. lamblia* nas fezes de crianças entre 3 e 6 anos de idade e identificaram os genótipos A (subtipo A2 e A3) e B (Ferreira et al., 2013). Assim, *Cryptosporidium* e *Giardia* circulam no meio ambiente, sendo a água considerada um potencial veículo de transmissão de criptosporidiose e giardíase em Portugal (Lobo et al., 2009).

Cryptosporidium e *Giardia* são os principais protozoários causadores de doenças diarreicas em todo o mundo, sendo os principais causadores de doenças transmitidas pela água (Smith et al., 2007). A infecção no homem pode ocorrer facilmente através da ingestão de água e alimentos uma vez que a dose infetante é baixa (1-10 quistos de *Giardia* e 10-100 ooquistos de *Cryptosporidium*) (Schets et al., 2013). Como o marisco é na maioria ingerido cru ou mal cozinhado, com pouco tempo de cozedura, estes protozoários ficam viáveis podendo facilmente provocar infecção (Gómez-Couso et al., 2005; Schets et al., 2013).

Uma vez que quistos de *Giardia* e ooquistos de *Cryptosporidium* conseguem sobreviver por longos períodos de tempo no ambiente, é importante desenvolver melhorias nas práticas de controlo de águas, de modo a diminuir a contaminação dos moluscos e assim proteger a saúde pública (Razzolini et al., 2016). O tratamento convencional das águas superficiais é geralmente por métodos físicos e químicos, filtração e desinfecção por cloração ou radiação UV. Os ooquistos de *Cryptosporidium* e quistos de *Giardia* são resistentes a estes tratamentos, levantando questões sobre a necessidade em alterar os métodos de tratamento de águas (Lobo et al., 2009).

Para que haja segurança no consumo de marisco é necessário que as empresas de produção de bivalves tenham o cuidado de fazer a depuração durante 7 dias ou pelo menos 1 a 3 dias antes de ser consumido, de modo a remover a maior parte das impurezas (Sutthikornchai *et al.*, 2016). Adicionalmente, é necessário também investir no desenvolvimento de métodos de desinfeção química e física da água, na educação sanitária e higiene pessoal dos manipuladores de alimentos e na implementação nas indústrias de informação sobre segurança alimentar.

Os métodos de prevenção e controlo devem estar sempre em alerta em relação à contaminação de alimentos e de água e manipulação destes para que o produto final seja seguro quando for consumido. Para isso, o Plano de Pontos Críticos de Controlo (HACCP) para os alimentos deveria incluir um controlo parasitário, uma vez que representam um risco para a saúde pública (Dawson, 2005).

Em conclusão, as técnicas de biologia molecular foram aplicadas com sucesso, conseguindo-se detetar genótipo A de *G. lamblia* nas ostras, podendo o seu consumo representar um risco para a saúde pública. É necessário desenvolver novas técnicas para a deteção e controlo de *Giardia* e *Cryptosporidium* nos alimentos de modo a serem aplicados em pontos críticos de controlo nas águas e moluscos bivalves.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- ADAMU, Haileyesus *et al.* - Distribution and Clinical Manifestations of *Cryptosporidium* Species and Subtypes in HIV/AIDS Patients in Ethiopia. PLoS Neglected Tropical Diseases. ISSN 19352735. 8:4 (2014).
- ADELL, A. D. *et al.* - Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in mussels (*Mytilus californianus*) and California sea lions (*Zalophus californianus*) from central California. Applied and Environmental Microbiology. ISSN 10985336. 80:24 (2014) 7732–7740.
- ALMEIDA, Andre; POZIO, Edoardo; CACCIO, Simone M. - Genotyping of *Giardia duodenalis* Cysts by New Real-Time PCR Assays for Detection of Mixed Infections in Human Samples. Environmental Microbiology. 76:6 (2010a) 1895–1901.
- ALMEIDA, André *et al.* - Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in drinking water samples in the North of Portugal. Korean Journal of Parasitology. ISSN 17380006. 48:1 (2010b) 43–48.
- APPELBEE, A. J. *et al.* - Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. Veterinary Parasitology. ISSN 03044017. 112:4 (2003) 289–294.
- ARAÚJO, Ronalda Silva DE *et al.* - Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* species and *Giardia* assemblages in two watersheds in the metropolitan region of São Paulo, Brazil. Environmental Science and Pollution Research. . ISSN 16147499. 25:15 (2018) 15191–15203.
- ASAE - ASAE - HACCP, atual. 2007. Disponível em <http://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/haccp.aspx>>
- ASAE - ASAE - Riscos biológicos - Doenças de origem alimentar, atual. 2017. Disponível em: <http://www.asae.gov.pt>>
- BERRILLI, Federica *et al.* - Genotype characterisation of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animals by ssu-rRNA gene sequencing. Veterinary Parasitology. ISSN 03044017. 122:3 (2004) 193–199.
- BOQVIST, Sofia; SÖDERQVIST, Karin; VÅGSHOLM, Ivar - Food safety challenges and One Health within Europe. Acta Veterinaria Scandinavica. . ISSN 0044605X. 60:1 (2018) 1–13.
- BURNET, Jean Baptiste *et al.* - Spatial and temporal distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a drinking water resource: Implications for monitoring and risk assessment. Science of the Total Environment. . ISSN 18791026. 472:2014) 1023–1035.
- BURRI, Solange; VALE, Paulo - Contaminação de bivalves por DSP: risco de episódios de gastroenterites numa região de toxicidade endêmica. Revista Portuguesa de Saúde Pública. 24:1 (2006) 115–124.
- CARMENA, David - Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection , surveillance and implications for public ... January 2010 (2010).
- CASSINI, A. *et al.* - Impact of food and water-borne diseases on European population health. Current Opinion in Food Science. ISSN 22147993. 12:2016) 21–29.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention - Healthy water. Disponível em: https://www.cdc.gov/healthywater/drinking/public/water_diseases.html. 2014.

CDC - Central for Disease Control and Prevention - Parasites Giardia. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/pathogen.html>. 2017.

CDC, Centers For Disease Control And Prevention- - Laboratory identification of parasitic diseases of public health concern - Cryptosporidiosis. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>. 2016.

CHALMERS, Rachel M.; DAVIES, Angharad P. - Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*. ISSN 00144894. 124:1 (2010) 138–146.

CODY, Mildred M.; STRETCH, Theresa - Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Food and Water Safety. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. . ISSN 22122672. 114:11 (2014) 1819–1829.

DAWSON, David - Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology*. ISSN 01681605. 103:2 (2005) 207–227.

DORNY, P. *et al.* - Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology*. ISSN 03044017. 163:3 (2009) 196–206.

EFSA - European Food Safety Authority, atual. 2017. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa>

EFSTRATIOU, Artemis; ONGERTH, Jerry E.; KARANIS, Panagiotis - Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Research*. ISSN 18792448. 114:2017) 14–22.

FAYER R, Trout JM, Lewis EJ, Santin M, Zhou L, Lal AA, Xiao L. Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. *Parasitol Res*. 2003 Jan;89(2):141-5.

FERREIRA SANTANA, Filipa *et al.* - Molecular and Clinical Characterization of *Giardia duodenalis* Infection in Preschool Children from Lisbon, Portugal. *Journal of Parasitology Research*. 2013:(2013).

FERREIRA *et al.*, - Urban Dog Parks as Sources of Canine Parasites: Contamination Rates and Pet Owner Behaviours in Lisbon, Portugal. *Urban Dog Parks as Sources of Canine Parasites: Contamination Rates and Pet Owner Behaviours in Lisbon, Portugal*. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*. ISSN 18196608. 11:16 (2017) 9815–9819.

F. FREIRE-SANTOS, A. M. OTEIZA-LOPEZ, C. A. VERGARA-CASTIBLANCO, E. ARES-MAZA'S, E. Alvarez-Suares - Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Bivalve Molluscs Destined for Human Consumption. Source: *The Journal of Parasitology J. Parasitol*. ISSN 00223395 (ISSN). 84:844 (2000) 783–788.

FDA - FDA Retail Food Program Steering Committee. FDA report on the occurrence of foodborne illness risk factors in selected institutional foodservice, restaurant, and retail food store facility types, atual. 2009. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodFafety/RetailFoodProtection/>

GHOZZI, Khemissa *et al.* - First report of Tunisian coastal water contamination by protozoan parasites using mollusk bivalves as biological indicators. *Marine Pollution Bulletin*. ISSN 18793363. 117:1–2 (2017) 197–202.

GIANGASPERO, Annunziata *et al.* - International Journal of Food Microbiology *Cryptosporidium parvum* genotype IIa and *Giardia duodenalis* assemblage A in *Mytilus galloprovincialis* on sale at local food markets. *International Journal of Food Microbiology*. ISSN 0168-1605. 171:2014) 62–67.

GÓMEZ-COUSO, H. *et al.* - Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. *International Journal of Food Microbiology*. ISSN 01681605. 91:3 (2004) 279–288.

GÓMEZ-COUSO, H *et al.* - Occurrence of *Giardia* cysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) destined for human consumption. *Journal of Food Protection* 2005 Aug;68(8):1702-5.

Graczyk TK, Lewis EJ, Glass G, Dasilva AJ, Tamang L, Girouard AS, Curriero FC Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Parasitol Res.* 2007 Jan;100(2):247-53.

HOHWYER, J *et al.* - Tools and Methods for Detecting and Characterizing *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Toxoplasma* Parasites in Marine Mollusks. *Journal of Food Protection*. ISSN 0362-028X. 76:9 (2013) 1649–1657.

HOPKINS, Richard M. *et al.* - Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *The Journal of parasitology*. ISSN 0022-3395. 83:1 (1997) 44–51.

HÖRMAN, A. *et al.* - Indicator Organisms in Surface Water in and Indicator Organisms in Surface Water in Southwestern. *Applied and environmental microbiology*. 70:1 (2004) 87–95.

JÚLIO, Cláudia; SÁ, Cátia; *et al.* - Waterborne transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* at river beaches in Southern Europe (Portugal). *Journal of Water and Health*. ISSN 14778920. 10:3 (2012a) 484–496.

JÚLIO, Cláudia; VILARES, Anabela; *et al.* - Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal. *Parasites and Vectors*. ISSN 17563305. 5:1 (2012b) 22.

KOLOREN, Zeynep; AYAZ, Emine - Genotyping of *Cryptosporidium* spp. in environmental water in Turkey. *Acta Parasitologica*. ISSN 12302821. 61:4 (2016) 671–679.

LALONDE, Laura F.; GAJADHAR, Alvin A. - Detection and Differentiation of Coccidian Oocysts by Real-Time PCR and Melting Curve Analysis. *Journal of Parasitology*. ISSN 0022-3395. 97:4 (2011) 725–730.

LEAL, Diego Averaldo Guiguet; FRANCO, Regina Maura Bueno - Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle. *Revista Panamericana de Infectologia*. 10:4 (2008) 48–57.

LEONI, F. *et al.* - Multilocus genetic analysis of *Cryptosporidium* in naturally contaminated bivalve molluscs. *Journal of Applied Microbiology*. ISSN 13645072. 103:6 (2007) 2430–2437.

LÉVESQUE, Barthe C, Dixon BR, Parrington LJ, Martin D, Doidge B, Proulx JF, Murphy D. Microbiological quality of blue mussels (*Mytilus edulis*) in Nunavik, Quebec: a pilot study. *Can J Microbiol*. 2010 Nov;56(11):968-77.

LOBO, M. L. *et al.* - Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Letters in Applied Microbiology*. ISSN 02668254. 48:6 (2009) 732–737.

LOPEZ-ROMERO, G. *et al.* - Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunology*. ISSN 13653024. 37:8 (2015) 394–406.

MANGEN, Marie-Josée J. *et al.* - International Journal of Food Microbiology Cost-of-illness and disease burden of food-related pathogens in the. *International Journal of Food Microbiology*. ISSN 0168-1605. 196:2015) 84–93.

MARANGI, Marianna *et al.* - Multiplex PCR for the detection and quantification of zoonotic taxa of *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Toxoplasma* in wastewater and mussels. *Molecular and Cellular Probes*. ISSN 10961194. 29:2 (2015) 122–125.

MELO, Pedro C. *et al.* - *Cryptosporidium* spp. in freshwater bivalves in Portugal. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. ISSN 15507408. 53:SUPPL. 1 (2006) 28–29.

MONS, Céline *et al.* - Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. *Water Research*. ISSN 00431354. 43:1 (2009) 211–217.

NEWMAN, K. L. *et al.* - The impact of socioeconomic status on foodborne illness in high income countries: a systematic review. *HHS Public Access*. 143:12 (2015) 2473–2485.

PAGOSO, Edison Jay A.; RIVERA, Windell L. - *Cryptosporidium* species from common edible bivalves in Manila Bay, Philippines. *Marine Pollution Bulletin*. ISSN 18793363. 119:1 (2017) 31–39.

PALOS LADEIRO, M. *et al.* - Protozoa interaction with aquatic invertebrate: Interest for watercourses biomonitoring. *Environmental Science and Pollution Research*. ISSN 09441344. 20:2 (2013) 778–789.

PALOS LADEIRO, M. *et al.* - Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Interest for water biomonitoring. *Water Research*. ISSN 00431354. 48:1 (2014) 148–155.

RAMO, Ana *et al.* - Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in raw and finished drinking water in north-eastern Spain. *Science of the Total Environment*. ISSN 18791026. 580:2017) 1007–1013.

RANJBAR, Reza; BAGHAEI, Kaveh; MOJARAD, Ehsan Nazemalhosseini - Genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. among patients with gastrointestinal complaints. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. ISSN 20084234. 9:4 (2016) 301–307.

RAZZOLINI, M. T. P.; SANTOS, T. F. D. S.; BASTOS, Veridiana Karmann - Detection of

- Giardia* and *Cryptosporidium* cysts/oocysts in watersheds and drinking water sources in Brazil urban areas. *Journal of Water and Health*. ISSN 14778920. 8:2 (2010) 399–404.
- RAZZOLINI, Maria Tereza Pepe *et al.* - *Giardia* and *Cryptosporidium* infection risk by simultaneous exposure to drinking water. *Microbial Risk Analysis*. ISSN 23523522. 4:2016) 1–6.
- REHN, Moa *et al.* - Post-infection symptoms following two large waterborne outbreaks of *Cryptosporidium hominis* in Northern Sweden, 2010-2011 *Infectious Disease epidemiology. BMC Public Health*. ISSN 14712458. 15:1 (2015) 1–6.
- ROBERTSON, L. J. - The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. *International Journal of Food Microbiology*. ISSN 01681605. 120:3 (2007) 201–216..
- ROBERTSON, Lucy J. *et al.* - Have foodborne parasites finally become a global concern? *Trends in Parasitology*. ISSN 14714922. 29:3 (2013) 101–103.
- RYAN, Una; HIJJAWI, Nawal; XIAO, Lihua - Foodborne cryptosporidiosis. *International Journal for Parasitology*. ISSN 18790135. 48:1 (2017) 1–12.
- SATO, Maria Ines Z. *et al.* - Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. *Science of the Total Environment*. ISSN 00489697. 442:2013) 389–396.
- SCHETS, Franciska M. *et al.* - *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*. ISSN 01681605. 113:2 (2007) 189–194.
- SCHETS, Franciska M.; BERG, Harold H. J. L. VAN DEN - Determination of the Recovery Efficiency of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts from Seeded Bivalve Mollusks. *Journal of Food Protection*. ISSN 0362-028X. 76:1 (2013) 93–98.
- SELSTAD UTAAKER, Kjersti; ROBERTSON, Lucy J. - Climate change and foodborne transmission of parasites: A consideration of possible interactions and impacts for selected parasites. *Food Research International*. ISSN 18737145. 68:2015) 16–23.
- SMITH, H. V. *et al.* - *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology*. ISSN 03044017. 149:1–2 (2007) 29–40.
- SOUSA, M. C. *et al.* - Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. ISSN 10665234. 53:SUPPL. 1 (2006) 174–176.
- SOUZA, Doris Sobral Marques *et al.* - Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. ISSN 01476513. 76:1 (2012) 153–161.
- SUTTHIKORNCHAI, Chantira *et al.* - Oyster is an effective transmission vehicle for *Cryptosporidium* infection in human. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. ISSN 19957645. 9:6 (2016) 562–566.

SWITAJ, Timothy L.; WINTER, Kelly J.; CHRISTENSEN, Scott R. - Diagnosis and management of Foodborne illness. *American Family Physician*. ISSN 15320650. 92:5 (2015) 358–365. doi: d12133 [pii].

TEI, Freda F. *et al.* - Assessment and molecular characterization of human intestinal parasites in bivalves from orchard beach, NY, USA. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. ISSN 16604601. 13:4 (2016).

THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. - Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution*. ISSN 15677257. 40:2016) 315–323.

TODD, E. C. D., GREIG, J. D., BARTLESON, C. A., & MICHAELS, B. S. - Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 3. Factors contributing to outbreaks and description of outbreak categories. *Journal of Food Protection*. 2007 2199–2217.

VALE, Paulo - Biotoxinas marinhas Marine biotoxins. *Revista portuguesa de Ciências veterinárias*. 99:549 (2004) 03-18.

VELUSAMY, Vijayalakshmi *et al.* - An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*. ISSN 07349750. 28:2 (2010) 232–254.

WHO - Water-related diseases. In: *Water Sanitation and Health*, atual. 2006. a. Disponível em: www.who.int/water_sanitation_health/dis

WHO - Core Health Indicators, atual. 2006. b. Disponível em [:www3/who/int/whois/core/core_select_process.cfm](http://www3/who/int/whois/core/core_select_process.cfm)

WHO - The world health report, 2007. *Global public health security in the 21st century*. Geneva, atual. 2007. Disponível em: <https://www.who.int/whr/2007/en/>

WHO - World Health Organization - Security, Nutrition and food, atual. 2017. a. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/nutrition/en/

WHO - World Health Organization - (JECFA), FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, atual. 2017. b. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/jecfa/en/

WHO - World Health Organization - International food standards (Codex Alimentarius), atual. 2017. c. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/food-standard/en/

WHO - World Health Organization - WHO - Food Safety - Microbiological Risks atual. 2017. d. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/microbiological-risks/en/

WHO - World Health Organization - WHO - Food Safety Food Safety - Contaminants, atual. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

WILLIS, Jessica E. *et al.* - Static tank depuration and chronic short-term experimental contamination of Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) with *Giardia duodenalis* cysts. *International Journal of Food Microbiology*. ISSN 18793460. 192:2015) 13–19.

XIAO, L. *et al.* - Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and environmental microbiology*. ISSN 0099-2240. 65:4 (1999)

1578–1583.