

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Diego Averaldo Guiguet Leal**

**Avaliação da contaminação de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) por espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* em um ambiente de estuário do litoral de São Paulo.**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Diego Averaldo Guiguet Leal  
R. Maura Bueno Franco  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Regina Maura Bueno Franco

CAMPINAS, SP  
2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**L473a**

Leal, Diego Averaldo Guiguet

Avaliação da contaminação de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) por espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* em um ambiente de estuário do litoral de São Paulo / Diego Averaldo Guiguet Leal. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Regina Maura Bueno Franco.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Cryptosporidium*. 2. *Giardia*. 3. Moluscos bivalves.  
4. Água do mar. 5. Esgotos. I. Franco, Regina Maura Bueno. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Evaluation of the contamination of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) by species of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a estuarine environment from São Paulo coast.

**Palavras-chave em inglês:** *Cryptosporidium*; *Giardia*; Bivalve molluscs; Sea water; Sewage.

**Área de concentração:** Parasitologia.

**Titulação:** Mestre em Parasitologia.

**Banca examinadora:** Regina Maura Bueno Franco, Marlene Tiduko Ueta, Luis Antonio de Oliveira Proença.

**Data da defesa:** 01/08/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Parasitologia.

**Campinas, 01 de Agosto de 2008.**

Banca examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Maura Bueno Franco  
(Orientadora)

  
Assinatura

Prof. Dr. Luis Antonio de Oliveira Proença

  
Assinatura

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlene Tiduko Ueta.

  
Assinatura

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fosca Pedini Pereira Leite

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Dias Bevilacqua

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço:

A Deus por me dar forças, calma e perseverança para a execução deste trabalho;

Aos meus queridos pais e irmãos, que nunca estiveram distantes, jamais deixaram de acreditar em meu potencial e sempre me incentivaram a me dedicar à minha profissão, que eu amo tanto.

A minha querida e companheira namorada que sempre esteve ao meu lado, dando apoio e carinho em todos os momentos e etapas deste trabalho.

A professora e orientadora Regina Maura Bueno Franco, a quem eu muito admiro e respeito, pela enorme dedicação e confiança e especialmente também por me ensinar a pensar e agir como um pesquisador.

Ao Sr. José Luis Llanos Carrillo, pelo auxílio e dedicação na análise estatística.

Aos meus colegas de trabalho, Sandra, Nilson, Rita, Taís, Maurício e Luciana pela colaboração, sugestões e companheirismo.

A SANASA e especialmente a Romeu Cantúcio Neto pelo apoio e pelas análises microbiológicas.

Aos professores membros da pré-banca, pelas críticas e sugestões para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, pelo auxílio na identificação dos moluscos.

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

## RESUMO

Moluscos bivalves por serem eficazes organismos filtradores acumulam e concentram substâncias, partículas e até mesmo patógenos em seus tecidos, se os locais onde vivem ou são cultivados receberem cargas de efluentes contaminados. Estes animais atuam como bioindicadores de contaminação fecal e, ao serem ingeridos crus ou mal cozidos, podem transmitir os patógenos acumulados em seus tecidos. Diversos estudos em diferentes países reportaram a presença de protozoários patogênicos como *Cryptosporidium* e *Giardia* em moluscos bivalves destinados ao consumo humano, porém, no Brasil estes dados são inexistentes. Diante deste cenário, é interessante e relevante investigar a ocorrência destes protozoários neste tipo de alimento, consumidos em diversas regiões do país. Este estudo teve a finalidade de avaliar a contaminação natural por oocistos e cistos dos protozoários parasitos em moluscos bivalves localizados em um ambiente de estuário do litoral norte do Estado de São Paulo; detectar as formas parasitárias em água de rio e água do mar; verificar se existe correlação entre fatores climáticos, físico-químicos e microbiológicos e a ocorrência natural dos parasitos nestes ambientes aquáticos e verificar se existe correlação entre a qualidade das águas e a contaminação dos moluscos que vivem nesta região. Os exemplares de moluscos foram processados através da homogeneização de tecidos específicos e submetidos a centrífugo-concentração com éter-PBS e as amostras hídricas foram analisadas pela técnica de filtração em membranas. A visualização dos protozoários foi realizada através da reação de imunofluorescência direta e a confirmação da morfologia dos protozoários feita com a utilização de microscopia de contraste de fase e a incorporação de um corante vital (DAPI). Cistos de *Giardia* foram detectados em 8 das 12 amostras de água do rio e uma amostra continha oocistos de *Cryptosporidium*. Ambos os patógenos foram detectados na água do mar, onde *Cryptosporidium* esteve presente em 40,0 % e *Giardia* em 20,0 % do total amostrado. O pool de homogenizados teciduais de brânquias foi positivo para oocistos e cistos em dois períodos, com concentrações de 12/ooocistos/animal e 50 cistos/animal. Não houve associação significativa entre os fatores climáticos, físico-químicos e microbiológicos e o número de oocistos detectados na água do rio e na água do mar; para os cistos, foi encontrada uma correlação significativa com coliformes termotolerantes ( $p = 0,007$ ) na água do mar. Ademais, não foi possível estabelecer correlação entre a qualidade da água e o número de cistos e oocistos detectados nos tecidos das ostras. Esta é a primeira vez que oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* foram encontrados em ostras de uma região costeira do país e também na América Latina. Estes achados têm importância para a saúde pública, pois refletem a extensão da contaminação dos ambientes e dos alimentos de origem marinha, requerendo a padronização de um controle de qualidade.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp.; *Giardia* spp.; moluscos bivalves;

*Crassostrea rhizophorae*; água do mar; água de rio; estuário; esgoto.

## ABSTRACT:

Bivalve molluscs are great filter feeders that may accumulate and concentrate substances, particles and even pathogens in their tissues, if the places that they inhabit or are cultivated receive contaminated effluents dispose. These animals, which serve as biological indicators of faecal contamination, may transmit the protozoa accumulated in their tissues, whenever they are ingested in a raw or lightly cooked form. Several studies in different countries reported the presence of parasite protozoa like *Cryptosporidium* and *Giardia* in bivalve molluscs destined for human consumption, however, in Brazil, these data are non-existent. For this reason, it is interesting and relevant the investigation of the occurrence of these protozoan in this type of food, consumed in different regions of the country. The aim of this study was to evaluate the natural contamination of oocysts and cysts of parasite protozoan in bivalve molluscs located in an estuarine environment in the Northern coast of São Paulo State; detect this protozoan in river and seawater; verify if there is a correlation between climatic, microbiological, physical and chemical factors with the natural occurrence of parasites in aquatic environments and verify if there is a correlation between water quality and the contamination of bivalve molluscs present at the region. Bivalve molluscs were processed through the homogenization of specific tissues and submitted to centrifugal concentration with ether-PBS, and water samples were analyzed by membrane filtration technique. Protozoa were visualized with direct immunofluorescence antibody test and to confirm the morphology of the parasites, contrast-phase microscopy and the incorporation of a vital dye (DAPI) were used. *Giardia* cysts were detected in 8 of 12 samples of river water and one sample contained *Cryptosporidium* oocysts. Both pathogens were detected in marine water where *Cryptosporidium* were present in 40,0% and *Giardia* in 20,0% of all samples analyzed. Gill pools homogenates of oysters were positive for oocysts and cysts in two periods with a mean concentration of 12 oocysts/oyster and 50 cysts/oyster. There was no significant association between the climatic, physical, chemical and microbiological factors with the number of oocysts detected in river water and in seawater; for cysts, it was found a high association only with thermotolerant coliforms ( $p = 0,007$ ) in seawater. Moreover, it was not possible to establish correlation between water quality and the number of oocysts and cysts detected in oysters tissues. This is the first time that *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts were found in oysters from the coastal region of Brazil, and it is also the first report in Latin America to date. These findings might be of public health importance, reflecting the extension of the contamination in marine environment and on seafood, requiring a need for quality control standards.

Key-words: *Cryptosporidium* spp.; *Giardia* spp.; bivalve molluscs; *Crassostrea rhizophorae*; seawater; river water; estuary; sewage.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> .....	<b>15</b>
<b>Figura 2</b>	Evolução da produção aquícola brasileira no período entre 1996 a 2005 em relação à quantidade produzida em toneladas.....	<b>36</b>
<b>Figura 3</b>	Localização do ponto de coleta das amostras na praia do Camaroeiro, Litoral Norte de São Paulo.....	<b>56</b>
<b>Figura 4</b>	Praia do Camaroeiro – Caraguatatuba- São Paulo.....	<b>57</b>
<b>Figura 5</b>	Praia do Camaroeiro – Caraguatatuba- São Paulo.....	<b>57</b>
<b>Figura 6</b>	Rio Ipiranga desaguando no mar na praia do Camaroeiro.....	<b>58</b>
<b>Figura 7</b>	Confluência da água do rio e do mar e ponto de coleta das ostras.....	<b>58</b>
<b>Figura 8</b>	Ostra ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> )	<b>59</b>
<b>Figura 9</b>	Etapa de eluição das membranas: (a) antes e (b) após raspagem e lavagem.....	<b>64</b>
<b>Figura 10</b>	Cistos de <i>Giardia</i> visualizados por RID nas amostras de água do rio Ipiranga.....	<b>81</b>
<b>Figura 11</b>	Cistos de <i>Giardia</i> visualizados por RID nas amostras de água do rio Ipiranga.....	<b>81</b>
<b>Figura 12</b>	Cistos de <i>Giardia</i> visualizados por RID nas amostras de água do rio Ipiranga.....	<b>81</b>

<b>Figura 13</b>	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. detectados em amostras de água do mar.....	<b>84</b>
<b>Figura 14</b>	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. detectados em amostras de água do mar.....	<b>84</b>
<b>Figura 15</b>	Cisto de <i>Giardia</i> encontrado na água do mar da praia do Camaroeiro.....	<b>84</b>
<b>Prancha 1</b>	Cistos e oocistos detectados através da RID e de contraste de fase nas amostras analisadas (rio e mar) sob influência de partículas e fluorescência residual.....	<b>99</b>
<b>Prancha 2</b>	Diferenciação de organismos encontrados nas amostras hídricas dos protozoários <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> .....	<b>113</b>

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Espécies de <i>Cryptosporidium</i> com potencial infectante para seres humanos.....	<b>18</b>
<b>Tabela 2</b>	Assembléias de <i>Giardia duodenalis</i> patogênicas para os seres humanos e de caráter zoonótico.....	<b>23</b>
<b>Tabela 3</b>	Surtos de etiologia bacteriana e viral (n = 46) reportados em diversas localidades do mundo e associados com o consumo de moluscos bivalves, no período compreendido entre 1969 a 2000.....	<b>39</b>
<b>Tabela 4</b>	Ocorrência de contaminação natural por <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em diferentes espécies de bivalves comestíveis em diversos países do mundo.....	<b>43</b>
<b>Tabela 5</b>	Ocorrência natural de cistos e oocistos/L e fatores abióticos (físico-químicos e climáticos) em um ano de amostragem na água do rio Ipiranga com periodicidade mensal.....	<b>82</b>
<b>Tabela 6</b>	Ocorrência natural de cistos e oocistos/L e fatores abióticos (físico-químicos e climáticos) durante o período de dez meses de amostragem da água da praia do Camaroeiro com periodicidade mensal.....	<b>85</b>
<b>Tabela 7</b>	Ocorrência natural de oocistos e cistos nos pool teciduais de 10 ostras da praia do Camaroeiro, Litoral Norte do Estado de São Paulo, examinadas com periodicidade mensal.....	<b>87</b>
<b>Tabela 8</b>	Análise bacteriológica de indicadores de contaminação fecal da água do rio Ipiranga em um ano de amostragem.....	<b>88</b>

<b>Tabela 9</b>	Análise bacteriológica de e indicadores de contaminação fecal da marinha da praia do Camaroeiro em um ano de amostragem.....	<b>89</b>
<b>Tabela 10</b>	Monitoramento da precipitação no município de Caraguatatuba no período de julho de 2006 a junho de 2007.....	<b>90</b>
<b>Tabela 11</b>	Ensaio controle (n = 3) realizados para a verificação da sensibilidade da metodologia empregada para a detecção de protozoários patogênicos na água do mar.....	<b>91</b>

## SUMÁRIO

Resumo.....	v
Abstract .....	vi
Lista de figuras.....	vii
Lista de tabelas.....	ix
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	7
2.1 Protozoários patogênicos de veiculação hídrica e alimentar: considerações gerais.....	7
2.2 Gênero <i>Cryptosporidium</i> .....	9
2.3 Gênero <i>Giardia</i> .....	21
2.4 Contaminação por protozoários patogênicos no ambiente marinho.....	27
2.5 Moluscos bivalves: aquicultura no Brasil e no mundo.....	33
2.5.1 Surtos de infecções associados ao consumo de bivalves.....	36
2.5.2 Métodos para a detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e cistos de <i>Giardia</i> em moluscos bivalves.....	45
2.5.3 Normas de controle para a criação e comercialização de moluscos bivalves no Brasil.....	50
3. Objetivos.....	54
4. Material e Métodos.....	55
4.1 Caracterização e critérios de escolha do local da coleta.....	55
4.2 Coleta dos exemplares de moluscos.....	59
4.3 Verificação da contaminação natural nas diferentes amostras.....	60
4.3.1 Exame parasitológico dos bivalves.....	60
4.3.1.1 Cálculo do número de oocistos e cistos encontrados por animal....	63
4.3.2 Coleta e exame da água marinha e de rio para a pesquisa dos protozoários parasitos <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> .....	63
4.3.2.1 Cálculo do número de oocistos e/ou cistos encontrados por litro na água do rio e na água marinha em situação natural de contaminação.....	66
4.4 Medição de fatores abióticos das amostras de água.....	66

4.5 Análise microbiológica das amostras de água.....	67
4.6 Experimentos em condições de contaminação artificial.....	68
4.6.1 Enumeração de oocistos e cistos (controle positivo).....	68
4.6.2 Experimento controle positivo para a água marinha.....	68
4.6.3 Experimento controle positivo dos invertebrados.....	70
4.6.3.1 Coleta dos animais e da água marinha para o experimento de contaminação artificial.....	70
4.6.3.2 Depuração dos animais em aquário e contaminação artificial.....	70
4.6.3.2.1 Cálculo da sensibilidade da metodologia aplicada no ensaio controle dos bivalves.....	75
4.7 Visualização dos parasitos.....	78
4.8 Análise estatística.....	80
5 Resultados.....	81
5.1 Ocorrência natural dos protozoários patogênicos na água do rio Ipiranga.....	81
5.2 Ocorrência natural dos protozoários patogênicos na água do mar.....	83
5.3 Ocorrência natural de protozoários patogênicos em moluscos bivalves.....	86
5.4 Análises microbiológicas da água do rio e mar.....	88
5.5 Monitoramento pluviométrico anual no município de Caraguatatuba.....	90
5.6 Experimentos de contaminação artificial para a água marinha.....	91
5.7 Experimento de contaminação artificial dos bivalves.....	91
6 Discussão.....	92
6.1 Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> na água do rio Ipiranga.....	92
6.2 Ocorrência natural dos protozoários <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> na água marinha da praia do Camaroeiro.....	100
6.3 Ocorrência dos protozoários parasitos em ostras destinadas ao consumo humano.....	114

7 Conclusões.....	128
8 Referências Bibliográficas.....	131
9 Anexos.....	151
9.1 Anexo 1: Produção mundial aquícola de peixes, crustáceos e moluscos por principal produtor em 2005.....	151
9.2 Anexo 2: Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle.....	152
9.3 Anexo 3: Correlação entre o número de cistos e oocistos encontrados na água do rio Ipiranga com os fatores físico-químicos, climáticos e microbiológicos.....	181
9.4 Anexo 4: Correlação entre o número de cistos e oocistos encontrados na água do mar da praia do Camaroeiro com os fatores físico-químicos, climáticos e microbiológicos.....	182
9.5 Anexo 5: Artigo aceito para publicação – Journal of Water and Health.....	183

## 1. INTRODUÇÃO

A relação entre oferta e demanda de água emerge como uma questão chave para este século. A demanda humana excede em muito a disponibilidade de água doce potável na Terra. Em diversas regiões do globo, a população ultrapassou o ponto em que podia ser abastecida pelos recursos hídricos disponíveis e, na atualidade, existem 26 países que abrigam 262 milhões de pessoas que se encontram em áreas com escassez hídrica (MANCUSO e SANTOS, 2003).

Neste aspecto, o Brasil encontra-se em privilegiada situação. No território brasileiro estão localizadas as mais extensas bacias hidrográficas do planeta, destacando-se no cenário mundial pela elevada produção de água doce de seus rios, comportando 53,0 % da produção de água doce do continente sul-americano e 12,0 % do total mundial (REBOUÇAS et al, 2006).

A disponibilidade de menos de 1000 m<sup>3</sup> de água por pessoa/ano antecipou a escassez progressiva de água em diversos países do mundo, segundo projeções realizadas no intervalo de 1955 a 1990 (GUIDEBOOK TO GLOBAL WATER ISSUES, 1999).

A falta de água já ocorre em alguns países há mais de 50 anos, sendo a incidência maior nos continentes Asiático e Africano. Em 1955, já havia registros de países com escassez hídrica: Cingapura, Kuwait, Malta, Barbados, Djibuti e Jordânia (GUIDEBOOK TO GLOBAL WATER ISSUES, 1999).

De acordo com as projeções de crescimento populacional para o ano de 2025, novos países situados nestes continentes e o Haiti adentrarão esta lista:

Líbia, Marrocos, Egito, Camarões, África do Sul, Irã, Omã, Etiópia e Síria (GUIDE TO GLOBAL WATER ISSUES, 1999).

Além do problema da disponibilidade e de uma provável escassez de água em escala mundial, outra preocupação atual consiste no gerenciamento e na qualidade da água que será destinada à humanidade.

A água é essencial para a sobrevivência e homeostase do corpo humano e, necessária para as atividades relacionadas ao homem, como os processos industriais e a produção de alimentos.

No entanto, muitos dos mananciais utilizados pelo homem estão cada vez mais poluídos e degradados, seja pela falta de controle, pela falta de investimentos em coleta, disposição final e tratamento de efluentes e na disposição inadequada de resíduos sólidos e metais tóxicos (PASCALICCHIO, 2002; MANCUSO e SANTOS, 2003).

Adicione-se a este cenário, o crescente aumento da população mundial que vem demandando, de maneira contínua e progressiva, alimentos em quantidade e qualidade cada vez maiores, devendo estes serem produzidos com uma água da maior qualidade e isenta de quaisquer microrganismos patogênicos.

Deve-se considerar também que uma provável escassez hídrica afetaria diretamente a produção de alimentos e, encareceria significativamente o preço dos mesmos. Outros setores alimentícios como a aqüicultura, também necessita de uma água pura e de qualidade para que seus subprodutos possam ser exportados ou ofertados à população. Desta forma, a exploração de outros recursos alimentícios, como os que provêm do ambiente marinho cresce rapidamente no mundo e no Brasil (FAO, 2005).

As áreas costeiras são utilizadas como áreas de lazer, recreação e fonte de renda para as comunidades costeiras. Estas áreas albergam numerosas espécies de animais e vegetais que representam uma importante fonte de alimentação para a humanidade.

A aqüicultura trata do cultivo de animais ou de vegetais que necessitam do ambiente aquático para o desenvolvimento de parte ou da totalidade do seu ciclo vital onde se incluem o cultivo de peixes, camarões, ostras, mexilhões, vieiras, rãs, algas, entre outros (REBOUÇAS et al, 2006).

O ser humano utiliza a aqüicultura para suprir suas necessidades alimentícias há mais de 4.000 anos, sendo o continente Asiático pioneiro e detentor da maior produção mundial, uma vez que oito entre os dez maiores produtores estão localizados neste continente (FAO, 2005; DE SILVA, 1998).

Segundo Ostrensky e Borghetti (2006) a produção aqüícola brasileira aumentou de 27 toneladas no ano de 1971, para 246 mil toneladas produzidas em 2002. Na atualidade, o Brasil ocupa a 17ª posição entre os maiores produtores aqüícolas mundiais, com uma produção de quase 258.000 toneladas (FAO, 2005). Em apenas uma década, o país triplicou o valor da produção total do ano de 1996, ou seja, o valor líquido da produção passou de aproximadamente 298 para 915 mil dólares (FAO, 2005).

Considerando a aqüicultura, a produção de moluscos (maricultura) merece especial destaque visto que o cultivo de ostras superou a produção de peixes e crustáceos no período de 1998 a 2005, sendo *Crassostrea gigas* a espécie mais cultivada em todo o mundo (FAO, 2005).

Dispondo de um litoral de cerca de 8.000 km (PEREIRA E SOARES-GOMES, 2002), o Brasil possui um enorme potencial para a maricultura, embora ainda possa melhorar sua posição mundial, pois encontra-se atrás de países com menores condições naturais ou extensões territoriais como a França e o Egito (FAO, 2005). Apesar da crescente emergência da maricultura no país, há dificuldades para consolidação de sua posição como produtor e exportador mundial, uma vez que existe um déficit no controle higiênico-sanitário destes animais e das áreas em que são cultivados (MELO, 2007. O ESTADO DE SÃO PAULO, CADERNO AGRÍCOLA).

Ressalte-se que as áreas costeiras estão cada vez mais sujeitas aos impactos antrópicos, como a elevada concentração de esgotos domésticos lançados *in natura* diretamente nos mares ou nos rios, sendo que mais da metade dos domicílios brasileiros (51,5%) não dispõe de coleta e tratamento de esgoto (FVG, 2007). O acesso a esse serviço avançou de maneira muito lenta nos últimos 14 anos e, para reduzir à metade este déficit de saneamento, seriam necessários mais 56 anos e meio, ou seja, o Brasil chegaria ao ano de 2063 ainda com 25% das residências sem coleta e tratamento de esgoto (FGV, 2007)

As áreas costeiras são consideradas aquelas que sofrem influência direta ou indireta dos oceanos, onde incluem-se costões rochosos, praias, manguezais, estuários e proximidades de domínio do mar (PHILIPPI JUNIOR, 2005).

Até o ano de 2025, as projeções demográficas indicam que 75% da população mundial (6,3 bilhões de pessoas) poderão estar residindo em regiões costeiras ou áreas próximas (WHO, 2005).

A matéria orgânica, proveniente principalmente dos efluentes domésticos, juntamente com os poluentes é naturalmente depurada pelos ambientes aquáticos, porém, a capacidade de autodepuração desses corpos receptores está sendo gradativamente superada pela carga poluidora dos efluentes, face à aceleração do crescimento populacional (PHILIPPI JUNIOR, 2005).

Como consequência, as doenças veiculadas pela água tornaram-se muito freqüentes, especialmente aquelas causadas por protozoários intestinais emergentes e re-emergentes, como espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia*, que foram responsáveis pela maioria dos surtos de veiculação hídrica nos últimos 25 anos (SMITH et al, 2006b; KARANIS et al, 2007).

O consumo de moluscos bivalves vem sendo incentivado, pois são reconhecidos como uma excelente fonte protéica e de minerais como o zinco, contendo baixos teores calóricos, sendo atualmente empregados em dietas e muito consumidos pelas populações menos favorecidas economicamente (RIPPEY, 1994; PAULILO, 2002).

Os moluscos bivalves habitam ecossistemas aquáticos, sejam eles marinhos ou de água doce, refletindo diretamente as condições do ambiente em que vivem. Devido à contaminação de seu habitat natural, estes organismos atuam como bioindicadores de contaminação fecal provenientes de seres humanos e animais (GÓMEZ-COUSO et al, 2003; MILLER et al, 2005a).

Em nível global, um aspecto emergente e com fortes implicações em saúde pública consiste na contaminação de moluscos bivalves por protozoários patogênicos. A ocorrência natural de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* já foi reportada em diversos países em diferentes espécies de moluscos

bivalves destinados ao consumo humano (ROBERTSON, 2007). Por este motivo, os riscos potenciais da aquisição de protozooses mediante a ingestão de moluscos crus ou mal-cozidos têm sido discutidos em todo o mundo.

No Brasil e na América Latina não existem dados acerca da ocorrência natural de protozoários patogênicos neste tipo de alimento e, diante deste novo panorama, torna-se especialmente relevante e imperativo o monitoramento parasitológico das espécies de moluscos bivalves que serão ofertados à população.

A análise da água onde os moluscos são cultivados (como as fazendas de maricultura) e da água de seu ambiente natural, onde os mesmos estão disponíveis para a catação exploratória, também é extremamente importante, visto que existe um risco da ocorrência de surtos associados ao consumo destes animais, que podem remover e acumular patógenos presentes nestes locais.

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1 Protozoários patogênicos de veiculação hídrica e alimentar: considerações gerais**

*Cryptosporidium* e *Giardia* são os protozoários parasitos entéricos mais comuns do homem e de animais domésticos e são reconhecidos comumente como parasitos de um amplo espectro de hospedeiros silvestres (FAYER et al, 2004b; THOMPSON et al, 2004; APPELBEE et al, 2005).

Ambos os protozoários são transmitidos mediante a rota fecal-oral, após os estágios infectantes de *Cryptosporidium* e *Giardia* (oocistos e cistos, respectivamente) serem ingeridos por hospedeiros susceptíveis.

A transmissão para os seres humanos ocorre por meio do contato direto de hospedeiro para hospedeiro, ou de maneira indireta, via água ou alimentos contaminados, superfícies contaminadas e mecanicamente por artrópodes e, já se evidenciou a transmissão de oocistos de *Cryptosporidium* pela via aérea (FAYER et al, 2000a; TZIPORI e WARD, 2002; THOMPSON et al, 2004).

Esses protozoários apresentam características comuns que influenciam a epidemiologia destas parasitoses. A dose infectante é pequena; para o *Cryptosporidium* a ID<sub>50</sub>, isto é, a menor dose capaz de causar infecção em pelo menos 50,0 % dos indivíduos amostrados é considerada baixa. De acordo com experimentos realizados com voluntários adultos que receberam três diferentes isolados de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, o ID<sub>50</sub> variou de 9 a 1024 oocistos (OKHUYSEN et al, 1999). Para o início da infecção pelo protozoário *Giardia* também é requerida a ingestão de poucos cistos, entre 10 a 100 (RENDTORFF, 1954).

Os cistos e oocistos já são eliminados infectantes nas fezes de seus hospedeiros; são muito resistentes aos desinfetantes comumente empregados para potabilizar a água; permanecem estáveis em diferentes ambientes (FAYER et al, 2004b).

Apresentam elevado potencial para a dispersão ambiental de cistos e oocistos, uma vez que um grande número de formas parasitárias é eliminada nas fezes de hospedeiros infectados. Indivíduos imunodeficientes e animais jovens liberam juntamente com suas fezes cerca de  $10^9$ - $10^{10}$  oocistos de *Cryptosporidium* durante o curso da infecção, assim como a eliminação de cistos de *Giardia* pode chegar até  $10^7$  por grama de fezes, o que pode propiciar a contaminação da água destinada ao consumo humano, os alimentos e as áreas recreacionais e costeiras (FAYER et al, 2004a; CACCIÒ et al, 2005).

A veiculação hídrica de protozoários patogênicos tornou-se um assunto de extrema relevância em saúde pública ocorrendo mundialmente e atingindo também os países desenvolvidos, onde há um elevado grau de saneamento básico. Nos Estados Unidos, de 1965 a 2002, ocorreram 148 surtos de giardiose por veiculação hídrica com 30.009 casos confirmados. No período de 1984 a 2002, 69 surtos de criptosporidiose que afetaram 436.232 pessoas foram registrados (OLIVEIRA, 2005). Foram incriminadas como fontes de aquisição destas protozooses a água destinada para o consumo humano, bem como a ingestão acidental de águas recreacionais (OLIVEIRA, 2005).

No Brasil, não existe até o presente momento, surtos de veiculação hídrica devidamente documentados e atribuídos aos protozoários *Cryptosporidium* e

*Giardia* e, os dados de ocorrência dos mesmos em amostras hídricas, provêm em sua maioria de pesquisas científicas (FRANCO, 2007).

As infecções ocasionadas por estes protozoários patogênicos intestinais podem representar uma ameaça à saúde humana; no caso da giardiose, ocorre uma expressiva falha do desenvolvimento físico e cognitivo em crianças e a infecção por *Cryptosporidium* pode levar a um quadro de desidratação severa em categorias populacionais mais vulneráveis ou mais expostas, como os imunossuprimidos e imunodeficientes, pela ingestão de apenas um oocisto do protozoário, podendo ter término fatal (ROSE et al, 2002).

Assim, o entendimento dos mecanismos de controle destes protozoários no ambiente é necessário para que medidas corretivas e profiláticas possam ser tomadas. Para isto, mais estudos são necessários para a compreensão das fontes de contaminação, concentrações, sobrevivência e transporte destes protozoários no ambiente (ROSE et al, 2002; FAYER et al, 2004b), objetivando minimizar suas rotas de transmissão hídrica e alimentar e garantir o abastecimento seguro da água e de alimentos para toda a população e para as gerações futuras.

## **2.2 Gênero *Cryptosporidium***

O protozoário patogênico *Cryptosporidium* foi descoberto no início do século XX, em 1907 por Ernest Edward Tyzzer, que descreveu o encontro de um parasito nas glândulas gástricas de camundongos de laboratório e a eliminação de uma forma parasitária (oocisto) nas fezes dos camundongos.

Tyzzer nomeou o protozoário de *Cryptosporidium muris* em 1910 e, descreveu os estágios assexuados e sexuados do parasito em um mesmo

hospedeiro (ciclo monoxênico), porém, até aquele momento, com caráter taxonômico não completamente estabelecido.

No ano de 1912, este mesmo pesquisador publicou o achado de uma nova espécie do protozoário, o *Cryptosporidium parvum* (TYZZER, 1912). Através de infecção experimental em camundongos, demonstrou que *C. parvum* se desenvolvia apenas no intestino delgado dos camundongos e observou que os oocistos desta espécie eram menores que os da espécie anteriormente descrita.

Atualmente, *Cryptosporidium* é classificado como um protozoário patogênico pertencente ao Filo Apicomplexa; Classe Sporozoa; Sub-classe Coccidiasina; Ordem Eucoccidiorida; Sub-ordem Eimeriorina; Família Cryptosporidiidae (LEVINE et al, 1988; FAYER et al, 1997).

Nos quase setenta anos que se seguiram às descobertas de Tyzzer, o protozoário, bem como a enfermidade provocada por ele foram de certa forma negligenciados e ignorados pela comunidade científica, até os primeiros encontros da parasitose no ser humano, sendo considerada uma doença de baixa importância econômica e de pouca importância médica (FAYER et al, 1997).

Em 1976, dois grupos reportaram os primeiros casos de criptosporidiose em seres humanos, sendo o primeiro relato em uma criança imunossuprimida e com quadro de diarreia aguda auto-limitada e o segundo caso em um indivíduo adulto que fazia uso de medicamentos a base de corticóides, com diarreia aguda de curso prolongado (NIME et al, 1976; MEISEL et al, 1976).

Porém, somente seis anos mais tarde, no ano de 1982, houve um grande interesse acerca da doença provocada pelo protozoário, que emergiu concomitantemente ao advento da pandemia do vírus da imunodeficiência

adquirida (AIDS/SIDA). Este súbito interesse mundial deveu-se aos relatos de uma instituição dos Estados Unidos da América, o Centers for Disease Control (CDC) que reportaram a presença de diarreia severa em 21 indivíduos do sexo masculino, portadores do vírus HIV, em seis cidades norte americanas, determinando a importância da natureza oportunista do protozoário (GOLDFARB, 1982).

No ano de 1993, ocorreu o maior surto de veiculação hídrica por *Cryptosporidium* já reportado, na cidade de Milwaukee, Estado de Wisconsin, nos Estados Unidos, associado com a ingestão de água destinada ao consumo humano (MACKENZIE et al, 1994). Uma pequena fração de oocistos passou pelo sistema de tratamento de água de uma ETA (Estação de Tratamento de Água) da cidade e atingiu cerca de 403.000 pessoas, 4000 pessoas necessitaram ser hospitalizadas e 100 pessoas foram a óbito, dentre estes, 69 pacientes eram portadores do vírus HIV. O custo total do surto foi de 96 milhões de dólares, sem contar as indenizações às famílias dos portadores da AIDS (MACKENZIE et al, 1994). Após este surto de enormes proporções, ficou evidente a vulnerabilidade dos sistemas produtores de água e, naturalmente, atraiu a atenção de entidades públicas ligadas à saúde, agências de proteção ambiental, sistemas produtores de água e de diversos grupos de pesquisa em todo o mundo.

Em conseqüência, nas duas últimas décadas, houve um grande número de estudos e publicações sobre a criptosporidiose, principalmente sobre os aspectos biológicos do protozoário, caracterização genotípica, modos de transmissão, principais grupos e fatores de risco para a saúde pública, o tratamento da parasitose, com ênfase especial no desenvolvimento de métodos de recuperação

e detecção em amostras hídricas e alimentares (ROSE, 1997; SMITH e ROSE, 1998; WIEDENMANN et al, 1998; GRIFFITHS, 1998; FAYER et al, 2000a; 2004b; DAWSON, 2005; COULLIETTE, 2006; SMITH et al, 2007; ROBERTSON e GJERDE, 2007).

O *Cryptosporidium* é o único protozoário parasito intracelular que apresenta localização extra-citoplasmática, pois parasita a superfície das microvilosidades dos enterócitos intestinais (FAYER et al, 2000a; SODRÉ e FRANCO, 2001;).

O único estágio evolutivo encontrado fora do hospedeiro é o oocisto, que é a forma de resistência ambiental do protozoário e também a forma infectante. Seu tamanho varia de 3,0 a 8,5µm, tendo formato ovalado a esférico, apresentando uma parede de dupla membrana, o que lhe confere resistência contra o estresse ambiental a fatores limitantes à sua presença e persistência no ambiente (FAYER et al, 1997; SUNNOTEL et al, 2006).

A parede do oocisto de *Cryptosporidium* difere dos demais coccídios por apresentar em sua composição carboidratos, lipídeos, fibrilas de actina e a ligação de pontes de dissulfeto, que lhe confere uma natureza robusta (ROBERTSON e GJERDE, 2007).

Os oocistos do protozoário mantêm sua capacidade infectante inalterada por longos períodos e em condições inóspitas. Oocistos mantidos em água destilada sob temperaturas abaixo de 15°C continuaram infectantes por pelo menos 6 meses conforme demonstrado em experimento de infectividade animal utilizando camundongos neonatos; as formas parasitárias mantidas a 20°C e 25°C produziram infecção em camundongos após 6 meses e 3 meses de armazenamento respectivamente e, os oocistos ainda conseguiram infectar

camundongos, após uma semana de armazenamento a temperatura de 35°C (FAYER et al, 1998b). Em contraste, outros autores verificaram que com o aumento da temperatura para 20°C e 25°C, a inativação dos oocistos do protozoário é mais rápida, sendo que a completa inativação se deu após 3 meses e 2 meses respectivamente (KING et al, 2005).

A cloração, muito efetiva contra diversos agentes bacterianos, não afeta os oocistos e, mesmo quando aplicada em altas concentrações, como as utilizadas em estações de tratamento de água ou em piscinas, tem pouco ou nenhum efeito na inativação do protozoário (CARPENTER et al, 1999).

O oocisto apresenta uma sutura, por onde são eliminados 4 esporozoítos móveis, fenômeno este conhecido como excitação, que ocorre após a ingestão de oocistos infectantes por um hospedeiro susceptível (SODRÉ e FRANCO, 2001). Estes são desprovidos de esporocistos e eliminados já infectantes no ambiente o que não ocorre com os demais coccídios do Filo Apicomplexa (MONIS e THOMPSON, 2003).

Os esporozoítos liberados do oocisto invadem principalmente as células epiteliais (enterócitos) do intestino delgado e se alojam nas microvilosidades destas células, porém, é importante salientar que o protozoário pode se desenvolver em qualquer célula que apresente microvilosidades. Ocasionalmente são encontrados em células do epitélio pulmonar (FAYER, 1997; KOSEC et al, 2001).

Após a penetração dos esporozoítos nos enterócitos (Figura 1) inicia-se uma fase de reprodução assexuada no hospedeiro conhecida como merogonia,

onde os esporozoítos sofrem maturação e se desenvolvem em merozoítos ou merontes que podem ser de tipo I ou tipo II.

Os merontes de tipo I se reproduzem e multiplicam-se ativamente nos enterócitos infectados e podem infectar novas células adjacentes. Os merontes de tipo II não se multiplicam e são as formas responsáveis por iniciar o ciclo sexuado (gametogonia) dentro do hospedeiro. Nesta fase são formados os gametócitos que são de dois tipos: microgametócitos (gameta masculino) e macrogametócito (gameta feminino). Os microgametócitos livres fertilizam os macrogametócitos originando o zigoto; este último é diplóide e evolui e até a formação de oocistos (SODRÉ e FRANCO, 2001).

Após o desenvolvimento das fases assexuadas e principalmente a sexuada do parasito são formados dois tipos de oocistos no hospedeiro: oocistos de parede delgada, (correspondentes a 20,0 % do total de oocistos), que são responsáveis pela manutenção do ciclo biológico e aumento da parasitemia dentro do hospedeiro e, portanto, podem invadir outras células pelo mecanismo de auto-infecção interna, e os oocistos de parede grossa (80,0 % do total), que são eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados para a perpetuação da espécie (MONIS e THOMPSON, 2003).

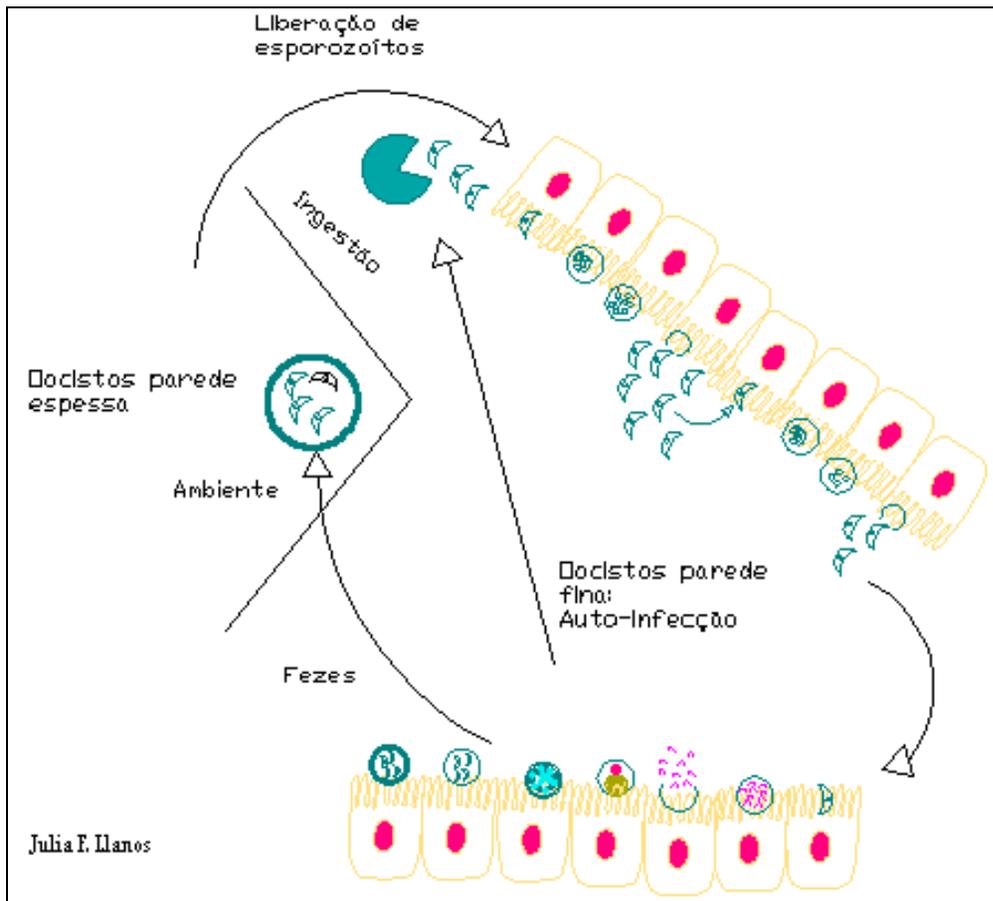


Figura 1: Ciclo biológico de *Cryptosporidium*.

A criptosporidiose afeta indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos. Em imunocompetentes a parasitose tem uma duração auto-limitada, sendo caracterizada pelo aparecimento de manifestações clínicas como diarreia, podendo ser acompanhada de dores abdominais, perda de apetite, febre baixa, náusea, vômitos, perda de peso, vertigens, mialgias, dores nas articulações e, infecções assintomáticas são relativamente freqüentes (FAYER et al, 2000a; HELLARD et al, 2000).

A doença pode ser particularmente severa e persistente entre os indivíduos que apresentam um comprometimento de seu sistema imunológico; no caso de portadores do vírus da AIDS, frequentemente é ameaçadora à vida humana.

Em pacientes que apresentam menos de 200 células T CD4/mm<sup>3</sup> (linfócitos T *helper*, auxiliares da resposta imune celular) podem desenvolver diarreia crônica e, muitas vezes, a hospitalização é necessária em função da severa desidratação ocasionada pelo protozoário (NAVIN et al, 1999; FARTHING, 2006).

Ainda nestes casos, a doença pode evoluir para uma forma fulminante: há registros de pacientes que eliminaram de 17 a 20 litros de fezes aquosas em um único dia, apresentando desidratação aguda (GRIFFITHS, 1998), além de em alguns casos, haver a migração do protozoário para sítios extra-intestinais, como o pulmão, fígado, pâncreas, dutos biliares e a conjuntiva do olho (FAYER, 1997).

Com a introdução da terapia antiretroviral – HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) no ano de 1997 a incidência da criptosporidiose e de outras infecções oportunistas entre a população infectada pelo HIV decresceu cerca de 60,0%. Entretanto, atualmente sabe-se que a recidiva da infecção pode ocorrer quando há a descontinuidade do tratamento (KAPLAN et al, 2000; MEAD, 2002).

Não obstante, atualmente sabe-se que não somente os portadores do vírus HIV, mas, também outros grupos populacionais podem ser gravemente afetados por diversas espécies de *Cryptosporidium* que apresentam potencial infectante para o ser humano (Tabela 1).

A criptosporidiose pode afetar com severidade crianças entre 0 a 5 anos (especialmente àquelas que freqüentam creches), idosos, desnutridos, diabéticos, pacientes que realizam hemodiálise ou quimioterapia, transplantados e os que

utilizam medicamentos a base de corticosteróides (FAYER et al, 2000a; CACCIÒ et al, 2005; FARTHING, 2006).

A classificação e diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* era um ponto bastante controvertido; recentemente, o surgimento das ferramentas moleculares auxiliou na elucidação e na classificação das espécies. Hoje, são levados em consideração os aspectos moleculares, a biologia, especificidade de hospedeiros e o tamanho dos oocistos (CACCIÒ et al, 2005; SUNNOTEL et al, 2006)

Atualmente são aceitas 17 espécies de *Cryptosporidium*, a saber: *C. parvum*, *C. hominis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. muris*, *C. suis*, *C. meleagridis*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae* (bovinos), *C. baileyi* e *C. galli* (aves), *C. molnari* e *C. scophthalmi* (peixes), *C. saurophilum* e *C. serpentis* (serpentes e lagartos), *C. wrairi* (porquinho-da-Índia), além de dois genótipos (“cervídeo” e de “macaco”) relacionados com a infecção no ser humano (SUNNOTEL et al, 2006; SMITH et al, 2007; FAYER et al, 2008).

**Tabela 1: Espécies de *Cryptosporidium* com potencial infectante para seres humanos.**

<b>Espécies</b>	<b>Hospedeiros susceptíveis</b>	<b>Local de parasitismo</b>	<b>Tamanho dos oocistos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Humanos; bovinos	Intestino delgado	4.5 x 5.5
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Humanos	Intestino delgado	4.5 x 5.5
<i>Cryptosporidium canis</i>	Humanos; canídeos	Intestino delgado	4.71 x 4.95
<i>Cryptosporidium felis</i>	Humanos; felídeos	Intestino delgado	4.5 x 5.0
<i>Cryptosporidium muris</i>	Humanos; roedores	Estômago	5.6 x 7.4
<i>Cryptosporidium suis</i>	Humanos; suínos	Intestino delgado/grosso	4.4-4.9 x 4.0-4.3
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Humanos; aves	Intestino delgado	4.0-4.5 x 4.6-5.2

Adaptado de Smith et al, 2007.

*Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis* são as principais espécies que infectam ambos, indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos em todo o mundo (SULAIMAN et al, 1998; MORGAN et al, 1998, 2000). Com exceção de *C. hominis*, cujo ciclo de transmissão é preferencialmente antroponótico, as demais espécies, incluindo *C. parvum*, apresentam um comportamento zoonótico, como outrora estabelecido (XIAO et al, 2004; CACCIÒ et al, 2005).

A criptosporidiose já foi relatada em mais de 40 países e em seis continentes (DILLINGHAM et al, 2002). Diferenças geográficas do encontro de ambas as espécies de *Cryptosporidium* já foram reportadas e sua prevalência varia nas diferentes regiões do mundo. *Cryptosporidium hominis* é mais prevalente (62,0 %, em média) na América do Norte e do Sul, na Austrália e na África,

enquanto *Cryptosporidium parvum* causa mais infecções em seres humanos na Europa (CACCIÒ et al, 2005).

No Reino Unido, por exemplo, o encontro de *Cryptosporidium parvum* é relatado freqüentemente (McLAUCHLIN et al, 1999, 2000; GOH et al, 2004) enquanto que nos Estados Unidos *C. hominis* é reportado mais comumente (PENG et al, 1997; SULAIMAN et al, 1998).

No Brasil, os dados de prevalência são variáveis, e alguns trabalhos demonstraram que *Cryptosporidium* era a causa mais comum de diarreia em 7,0% - 9,3 % dos pacientes portadores do vírus HIV (CIMERMAN et al, 1999; RIBEIRO et al, 2004); de 34,8 % e 25,0 % em indivíduos transplantados e pacientes submetidos à hemodiálise, respectivamente (JABUR et al, 1996) e entre crianças, até 17,0 % dos casos de diarreia, estavam associados com a infecção por *Cryptosporidium* (LOUREIRO et al, 1990; MANGINI et al, 1992; GENNARI-CARDOSO et al, 1996; FRANCO e CORDEIRO, 1996; OSHIRO et al, 2000). Prevalências mais atuais, demonstraram que entre crianças que freqüentam creches, maiores de 5 anos e com diarreia, 20,3% das amostras fecais continham o protozoário (CARVALHO-ALMEIDA, 2006).

A descoberta desse protozoário entra em seu primeiro centenário e, ainda hoje, existem muitos questionamentos acerca de sua epidemiologia ambiental, técnicas mais sensíveis de detecção ou uma terapia eficiente capaz de promover a cura parasitológica dos hospedeiros infectados.

Até o presente momento, já foram avaliados aproximadamente 200 fármacos para o tratamento da criptosporidiose e poucos foram eficazes (MEAD, 2002).

A nitazoxanida foi liberada para uso pediátrico, mas, sua eficácia e segurança em adultos saudáveis e indivíduos imunocomprometidos não foi completamente estabelecida (RAMIREZ et al, 2004).

Devido à escassez de alternativas de tratamento e considerando fatores como sua ampla dispersão, efetiva resistência ambiental e monitoramento deficiente da presença do patógeno no ambiente, a criptosporidiose emerge como uma doença desafiadora e preocupante, tanto para os países desenvolvidos quanto para os países emergentes e em desenvolvimento.

A preocupação com a presença do protozoário no ambiente quer seja em água destinada ao consumo humano ou em alimentos ingeridos crus é tão grande nos países desenvolvidos, que o *Cryptosporidium* está inserido na categoria B da lista do National Institutes of Health, dos Estados Unidos, que classifica os patógenos em 3 categorias (biodefesa), A, B e C, passíveis de serem utilizados em guerras biológicas e na lista da USEPA, entre os patógenos relevantes de ampla dispersão hídrica (U S ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1998; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2008).

### 2.3 Gênero *Giardia*

O protozoário *Giardia duodenalis* (sinonímia *G. lamblia*, *G. intestinalis*) foi primariamente descoberto por Antonie van Leeuwenhoek, no ano de 1681, quando examinava suas próprias fezes diarréicas em microscópio (DOBELL, 1920). No ano de 1859, Lambl descreveu detalhadamente a morfologia do protozoário e, por pensar que o parasito pertencia ao gênero *Cercomonas*, classificou-o como *Cercomonas intestinalis*, devido à sua localização no hospedeiro (Lambl, 1859 *apud* ADAM, 2001).

Nos anos subseqüentes, muitos outros pesquisadores classificaram o protozoário com diferentes terminologias: em 1888, Blanchard nomeou o parasito de *Lamblia intestinalis* (BLANCHARD, 1988 *apud* ADAM, 2001); no ano de 1902, Stiles modificou o nome para *Giardia duodenalis* (STILES, 1902 *apud* ADAM, 2001). Entre 1920 e 1930, mais de 50 espécies do protozoário já haviam sido descritas e, algumas décadas depois, Filice, no ano de 1952, propôs a separação das diferentes espécies do protozoário baseando-se em características morfológicas similares e de acordo com a sua especificidade de hospedeiros.

A *Giardia* é um protozoário flagelado, que está agrupado no Filo Sarcostigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Diplomonadida e à família Hexamitidae (LEVINE, 1980) e, é um dos mais antigos organismos eucariotos conhecidos. Apresenta uma ampla variedade de hospedeiros, podendo infectar diversas classes de vertebrados entre eles mamíferos, aves e répteis (ORTEGA e ADAM, 1997; APPELBEE, 2005).

A taxonomia do protozoário não está completamente estabelecida, porém, na atualidade, são reconhecidas seis espécies do protozoário: *G. duodenalis*

(infecta humanos; mamíferos domésticos e silvestres); *G. agilis* (anfíbios); *G. psittaci* (aves- psitacídeos), *G. ardeae* (aves silvestres); *G. muris* (roedores) e *G. microti* (rato almiscarado e rato calunga) (MONIS e THOMPSON, 2003).

*Giardia duodenalis* é a única espécie com potencial patogênico para o ser humano. Entretanto, com o advento das técnicas moleculares, ficou provado que *Giardia duodenalis* não é uma espécie uniforme e sim um complexo de espécies as quais exibem variedades genotípicas e fenotípicas distintas, ainda que genótipos similares morfologicamente apresentem diferenciada especificidade de hospedeiros (THOMPSON, 2004).

Desta forma, os genótipos foram divididos em vários grupos ou assembléias, como segue: grupos A, B, C, D, E, F e G sendo que apenas nos grupos A e B encontram-se os subgrupos capazes de infectar o ser humano (Tabela 2). Os grupos C e D são específicos de cães; E- ocorre em gado bovino, em suínos e em ovelhas; F- específico de gatos; e finalmente o grupo G, é hospedeiro específico de ratos domésticos (THOMPSON, 2004).

**Tabela 2: Assembléias de *Giardia duodenalis* patogênicas para os seres humanos e de caráter zoonótico.**

<b>Assembléia ou Grupo</b>	<b>Subgrupo</b>	<b>Hospedeiros</b>
A	A I (Zoonótico)	Humanos, Gado, Castores, Lêmure Cães, Gatos, Porquinho-da-Índia
A	A II	Humanos
B	B III (Zoonótico)	Humanos; Lêmure; Chinchilas; Castores; Gibão; Ratos; Cães
B	B IV	Humanos

\* Adaptado de Thompson, 2004.

As espécies de *Giardia* apresentam um ciclo simplificado de vida, onde ocorre a alternância de dois estádios evolutivos, o cisto e o trofozoíto. O cisto é a forma infectante e de resistência ambiental e responsável pelo início da infecção em um hospedeiro, tendo geralmente uma forma ovalada e tamanho aproximado de 8-12µm (ADAM, 2001). Após a exposição aos ácidos estomacais de um hospedeiro susceptível, ocorre a excitação liberando a forma de trofozoíto no intestino delgado do hospedeiro. O trofozoíto é a forma vegetativa, que se alimenta e se reproduz no hospedeiro e, no caso de *Giardia*, o trofozoíto reproduz-se somente assexuadamente por divisão binária simples (ORTEGA E ADAM, 1997).

Esta forma é móvel, contém quatro pares de flagelos e formato piriforme a elipsóide, tendo um tamanho aproximado de 12-15µm (THOMPSON, 2004).

O trofozoíto apresenta dois núcleos de mesmo tamanho e possui a presença de um disco ventral côncavo, também denominado de disco adesivo, constituído de microtúbulos que auxiliam a fixação do parasito à mucosa intestinal do hospedeiro; também estão presentes corpos medianos e axonemas (ALI e HILL, 2003).

As formas vegetativas não são invasivas e se locomovem livremente nas porções do intestino delgado, principalmente no duodeno e jejuno, sendo frequentemente encontradas aderidas à superfície do lúmen intestinal dos hospedeiros vertebrados onde vivem e se multiplicam (LANE E LLOYD, 2002).

A sintomatologia é variada, incluindo diarreia aguda ou crônica, distensão abdominal, náuseas, flatulência, anorexia, e perda de peso (ADAM, 2001; THOMPSON, 2004) até casos assintomáticos.

Os sintomas que predominam na infecção crônica por giardiose são: fezes diarreicas, perda de peso, dor abdominal, mal estar e má-absorção intestinal, sendo estes, indistinguíveis da síndrome do intestino irritável (STARK et al, 2007).

A má absorção de gorduras, que pode levar ao aparecimento das mesmas nas fezes (esteatorrêia) e de vitaminas lipossolúveis, também é freqüente em indivíduos que experimentam diarreia crônica ocasionada pelo parasito (OLIVARES et al, 2002).

A variabilidade de manifestações clínicas está relacionada com vários fatores do hospedeiro como seu status nutricional, idade, dose infectante, a deficiência congênita ou adquirida de IgA, a virulência inerente às diferentes cepas e, possivelmente, repetidas infecções pelo protozoário em um mesmo hospedeiro (ALI E HILL, 2003; RÖXSTROM-LINDQUIST et al, 2006).

A presença do parasito pode ocasionar falha no desenvolvimento físico e cognitivo em crianças, pois *Giardia* altera a permeabilidade epitelial aos nutrientes e vitaminas (por exemplo, os níveis de vitamina B 12 são menores nos pacientes com giardiose), devido a um efeito citopático direto induzido pelos produtos do parasito, ocorrendo injúrias na bordadura em escova, e a absorção é comprometida (BURET et al, 2002; SCOTT et al, 2002). Também é eliciada uma resposta inflamatória, com aumento de leucócitos e de células plasmáticas na lâmina própria (HANEVICK et al, 2007).

Contudo, diferentemente de *Cryptosporidium*, a giardiose apresenta uma terapêutica efetiva. O tratamento da parasitose é realizado comumente com metronidazol, administrado em doses (3 vezes ao dia, durante 5 - 7 dias em adultos), com uma eficácia de 80,0 % a 95,0 % (GARDNER e HILL, 2001).

Nitroimidazólicos e benzimidazólicos também são efetivos fármacos que podem ser utilizados para tratar as infecções humanas ocasionadas pelo protozoário (THOMPSON, 2004). O albendazol pode ser uma alternativa para o tratamento da parasitose, tendo demonstrado uma excelente atividade contra os isolados de *Giardia in vitro*. Quando analisado os efeitos do fármaco na ultra-estrutura dos trofozoítos, a morfologia do protozoário ficou distorcida e a adesão na mucosa intestinal foi impedida (CRUZ et al, 2003).

Deve-se ressaltar que na maioria dos casos, somente os indivíduos com sintomatologia aparente são submetidos ao tratamento. Contudo, a estratégia ideal para a minimização da entrada deste e de outros protozoários patogênicos intestinais no ambiente, seria tratar também os portadores assintomáticos, pois

estes são os disseminadores de cistos e peças-chaves na epidemiologia das parasitoses.

*Giardia duodenalis* apresenta uma distribuição cosmopolita, sendo o parasito intestinal mais frequentemente diagnosticado no ser humano em todo o mundo (THOMPSON e MONIS, 2004). Estima-se que ocorram  $2,8 \times 10^8$  casos por ano em todo o mundo (LANE e LLOYD, 2002). Nos continentes Asiático, Africano e na América Latina, em torno de 200 milhões de pessoas apresentam sintomatologia por *Giardia* com 500.000 novos casos reportados a cada ano (THOMPSON, 2004).

No que concerne à veiculação hídrica deste protozoário, aparentemente, os cistos de *Giardia* não sobrevivem tão bem como os oocistos de *Cryptosporidium* nos ambientes aquáticos, no entanto, cistos são mais frequentemente identificados e com concentrações superiores aos oocistos em água bruta e em água destinada para o consumo humano (CACCIÒ et al, 2005; OLIVEIRA et al, 2005; SMITH et al, 2006b) além de haver um maior número de surtos de giardiose documentados na literatura (SMITH e GRIMASON, 2003).

O primeiro surto de giardiose documentado ocorreu no ano de 1965, em Aspen, Colorado, nos Estados Unidos (CRAUN, 1990).

Um dos maiores surtos de giardiose descrito (em termos de indivíduos infectados) ocorreu na Noruega, no período compreendido entre 2004 e 2005 (ROBERTSON et al, 2006). Aproximadamente 1500 indivíduos foram diagnosticados com giardiose durante o outono e inverno destes anos e a fonte de contaminação foi atribuída ao esgoto doméstico que entrou em uma estação de tratamento de água, onde apenas a cloração era utilizada; sem a presença da

etapa de filtração, considerada crítica para a remoção dos protozoários patogênicos (ROBERTSON et al, 2006).

É interessante ressaltar que alguns pacientes experimentaram sintomas abdominais persistentes, a despeito do tratamento com metronidazol, durante este surto que ocorreu logo após fortes chuvas (HANEVIK et al, 2007).

Os sintomas podem perdurar durante várias semanas, mesmo após a eliminação do protozoário, devido à intolerância à lactose, que ocorre em cerca de 20,0% a 40,0% dos casos (FARTHING, 1996).

#### **2.4 Contaminação por protozoários patogênicos no ambiente marinho**

Áreas costeiras e regiões estuarinas estão sujeitas a uma ampla variedade de fatores que afetam e influenciam a qualidade dos ecossistemas e a saúde humana. A atenção para a poluição mundial dos ambientes marinhos despontou, primariamente, pelas florações de algas tóxicas e de bactérias patogênicas que se multiplicam em águas ricas em nutrientes (FAYER et al, 2004a).

As regiões costeiras, especialmente os estuários, recifes de corais e manguezais, suportam enormes quantidades de resíduos que são despejados no oceano. Na grande maioria dos países costeiros em desenvolvimento e em alguns países costeiros desenvolvidos, os efluentes domésticos e os resíduos industriais são despejados no mar sem nenhum tipo de tratamento (MILLER JUNIOR, 2007).

As cidades localizadas perto do mar Mediterrâneo, com uma população costeira de 200 milhões de pessoas (durante a alta temporada de turismo), liberam 85,0 % de seu esgoto diretamente no mar, sem tratamento, ocasionando a poluição das praias e a contaminação de mariscos (MILLER JUNIOR, 2007).

Um quarto das pessoas que freqüentam as praias nos Estados Unidos desenvolve infecções de ouvido, dor de garganta, irritações nos olhos, doenças respiratórias ou gastrointestinais pelo contato com a água ou ingestão acidental (MILLER JUNIOR, 2007).

O despejo de esgoto sem tratamento ou tratado em rios e mares compromete a qualidade destes corpos hídricos, pois podem introduzir diversos patógenos entéricos humanos e contribuir para a elevação dos níveis de nutrientes orgânicos nestas áreas (LIPP et al, 2001a).

Outro fator que maximiza a introdução de patógenos no ambiente é a presença de fezes de animais domésticos e de produção que são descartadas ou carregadas pela drenagem hídrica de sedimentos para áreas costeiras e estuários (FAYER et al, 2004a).

Em média, a população mundial é de aproximadamente 6.35 bilhões de habitantes, e cada indivíduo produz aproximadamente 200g de fezes por dia, o que leva a uma produção anual total de cerca de 232 milhões de toneladas métricas de fezes (FAYER et al, 2004a). Desta forma, sendo a maior parte dos efluentes liberados *in natura*, o potencial para a introdução e contaminação por agentes patogênicos em rios e áreas costeiras é enorme.

Além disso, dependendo do tipo de tratamento a que o esgoto é submetido, nem todos os agentes patogênicos serão efetivamente removidos antes do despejo dos efluentes tratados no ambiente (LAZAROVA et al, 2001; CANTUSIO-NETO et al, 2006).

A entrada dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* no ambiente marinho pode ser facilitada e estar associada com a presença de alguns animais silvestres,

como aves marinhas que freqüentam estas áreas, por meio de suas fezes na água (GRACZYK et al, 2007b).

Embora pesquisas sobre a presença de oocistos e cistos de espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* na água marinha não sejam tão freqüentes, ambos os protozoários já foram detectados em praias e regiões estuarinas de algumas regiões do mundo (ROBERTSON et al, 2007).

Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* foram detectados em algumas praias do Havaí, que recebiam despejo de esgoto; as fontes de contaminação incriminadas foram a presença de esgoto, drenagem hídrica de fezes e possivelmente descarte de fezes por indivíduos que navegavam em barcos (JOHNSON et al, 1995).

Os protozoários também já foram encontrados em outras regiões costeiras dos Estados Unidos, na Baía de Sarasota, costa leste da Flórida, onde em 3 pontos foi observada positividade para *Cryptosporidium* e um ponto apresentou contaminação por cistos de *Giardia* (LIPP et al, 2001a). A provável contaminação desta região pelos protozoários foi atribuída à presença de esgoto, rompimento de um cano de esgoto e possivelmente por acidentes fecais ocasionados por banhistas. Ainda na Flórida, os protozoários foram encontrados no estuário de Charlotte Harbor (LIPP et al, 2001b).

Na Ásia, em Hong Kong, Ho e Tam (1998) avaliaram apenas a presença do protozoário *Giardia*, (por ser endêmico no país e causa de gastroenterite crônica em humanos) em algumas praias selecionadas de acordo com os diferentes graus de poluição por esgoto e classificadas conforme a legislação vigente do país. O protozoário foi detectado na maioria das praias analisadas e, também em praias

consideradas ideais para a recreação humana, com concentrações variando de 1-23 cistos/L.

Em Sydney, na Austrália, ambos os protozoários foram detectados em uma região estuarina (estuário Georges River) em 6 pontos diferentes analisados. Os eventos de contaminação estavam associados a períodos de alta precipitação e despejo de esgoto (FERGUSON et al, 1996).

Existem relatos da ocorrência destes protozoários em algumas regiões européias. Na Turquia, foram examinados 12 pontos diferentes e, apenas em um ponto (em Tece) em uma única amostra, foi observada a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em água do mar (CEBER et al, 2005). Entretanto, estes autores não reportaram as prováveis fontes de contaminação e não utilizaram técnicas de detecção confiáveis como a reação de imunofluorescência direta (RID), com anticorpos monoclonais (anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*) para a detecção destes protozoários em amostras ambientais.

Na região da Galícia, costa noroeste da Espanha, foram examinados 7 pontos de quatro regiões estuarinas diferentes e, oocistos foram detectados em 5 pontos nas concentrações de 1-17 oocistos/L e os cistos em 6 pontos, variando de 0,4- 29.3 cistos/L (GÓMEZ-COUSO et al, 2005a; 2006a).

Outro relato recente provém do encontro destes protozoários em uma região costeira que abriga grande quantidade de ostras destinadas ou não ao comércio na Holanda (SCHETS et al, 2007).

A maioria dos estudos relatados na literatura sobre a persistência e resistência ambiental destes protozoários em água marinha, referem-se aos oocistos de *Cryptosporidium*. Atualmente, sabe-se que os oocistos do protozoário

podem sobreviver por longos períodos em água marinha (FAYER, 2004b) de acordo com experimentos realizados em condições artificiais de contaminação.

Um estudo demonstrou que oocistos mantidos em aquário marinho por 12 semanas, a 10°C, em salinidades de 10%, 20% e 30% permaneceram infectantes para camundongos, assim como aqueles mantidos a 20°C em salinidade de 10% continuaram infectantes por 12 semanas, a 20% por 4 semanas e a 30%, por 2 semanas (FAYER et al, 1998a).

O potencial infectante dos oocistos está diretamente relacionado com o tempo de armazenamento e as concentrações de salinidades em que estes são mantidos. As infecções nos camundongos foram mais efetivas quando se utilizou oocistos mantidos em baixas concentrações de salinidade e num curto período de armazenamento (FAYER et al, 1998a). No entanto, alguns autores comprovaram que mesmo em condições extremas de salinidade (35%), alguns oocistos conseguiram infectar camundongos após 40 dias de armazenamento (FREIRE-SANTOS et al, 1999).

O maior tempo de sobrevivência dos oocistos de *Cryptosporidium* relatado na literatura foi descrito por Tamburrini e Pozio (1999), onde oocistos do protozoário mantidos em aquário marinho, com salinidade controlada de 33ppt e em temperatura de 6 a 8°C, foram capazes de infectar camundongos após um ano de armazenamento.

Desta forma, a presença destes protozoários em áreas costeiras, representa um risco para populações de mamíferos marinhos (FAYER & LINDSAY, 2004; MÉNDEZ-HERMIDA et al, 2007a) e para os seres humanos, constituindo um sério problema de saúde pública.

No Brasil, os padrões de balneabilidade das praias obedecem à resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Nº. 274 de 2000 e considera que a saúde e o bem estar humano podem ser afetados pelas condições de balneabilidade das praias (BRASIL, 2000). A resolução dispõe que a água das praias deve ser considerada imprópria para fins recreacionais quando, na última amostragem, pelo menos um dos indicadores bacteriológicos de contaminação fecal é encontrado em concentrações superiores a:

- 2500 coliformes termotolerantes/ 100ml ou
- 2000 para *Escherichia coli*/ 100ml ou
- 400 para enterococos/ 100ml.

No Estado de São Paulo, este monitoramento é feito pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), que realiza semanalmente a análise das praias de diferentes municípios. Também são examinados os cursos de água afluentes às praias e, segundo a CETESB, os corpos que deságuam no litoral paulista (rios, córregos e canais) são os principais responsáveis pela variedade da qualidade das águas das praias, por receberem frequentemente contribuição de esgotos domésticos não tratados (CETESB, 2006).

Para a balneabilidade das praias, consideram-se representativos locais em que já tenha ocorrido a mistura das águas do mar com aquelas provenientes de corpos de água potencialmente poluídos. Já para os rios, córregos e canais é realizada a determinação da densidade de coliformes fecais em zonas em que não haja influência das marés, ou seja, as coletas são realizadas antes do corpo de água atingir as faixas da maré (CETESB, 2006)

Os corpos de água afluentes às praias e avaliados pela CETESB estão enquadrados, segundo o Decreto Estadual N.º 0755/77, na Classe 2. A resolução do CONAMA 357/05 estabelece para coliformes termotolerantes um padrão de 1000 UFC/100mL para corpos de água doce Classe 2 (BRASIL, 2005).

## **2.5 Moluscos Bivalves: aqüicultura no Brasil e no Mundo**

Os representantes do Filo Mollusca estão entre os grupos de animais invertebrados mais numerosos e antigos do Reino Animal. A classe Bivalvia, também conhecida como Pelecypoda ou Lamellibranchia, abriga animais como as ostras, vôngoles, mexilhões, mariscos, vieiras entre outros (RUPPERT e BARNES, 1996). Todos os representantes são aquáticos, sendo a maioria marinha. Existem aproximadamente 8.500 espécies de moluscos bivalves marinhos descritas em todo o mundo (ROBERTSON, 2007).

Os bivalves são achatados nas laterais e apresentam uma concha composta de duas valvas que se prendem por meio de uma estrutura protéica elástica e não calcificada, denominada de ligamento da dobradiça (RUPPERT e BARNES, 1996). As valvas das conchas são puxadas juntas, por meio de dois grandes músculos dorsais (músculos adutores) que tem ação antagônica ao ligamento da dobradiça.

Os moluscos bivalves encontrados no Brasil estão distribuídos em 44 famílias, com 379 espécies descritas (SANTOS, 1982). A grande maioria das espécies de moluscos bivalves é comestível e podem ser coletados de seu ambiente natural ou produzidos na aqüicultura.

As principais espécies de moluscos bivalves cultivados no Brasil são o mexilhão *Perna perna*, duas espécies de ostras, a nativa *Crassostrea rhizophorae* e a ostra do pacífico (*Crassostrea gigas*) e uma espécie de vieira, *Nodipecten nodosus* (BORGHETTI e OSTRENSKY, 2000).

As diversas espécies de ostras são muito consumidas em todo o mundo. O termo ostra designa um grupo de moluscos bivalves que se reproduzem e crescem em águas marinhas ou salobras; pertencem à ordem Ostreoida e família Ostreidae (SANTOS, 1982).

As ostras pertencentes ao gênero *Crassostrea* estão amplamente dispersas pela costa brasileira. Estes moluscos vivem cimentados em superfícies duras como rochas, por uma das valvas da concha nas zonas intertidais de áreas costeiras (NASCIMENTO, 1991).

*Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) também popularmente conhecida como ostra do mangue, é uma das espécies tropicais cultivadas no Brasil com mais alto valor comercial, sendo facilmente encontradas em estuários, mangues, e na orla das praias (BOFFI, 1979; GOSLING, 2003).

O cultivo de moluscos filtradores no Brasil é favorecido, pois o litoral brasileiro apresenta baías, enseadas, regiões estuarinas-lagunares e manguezais, sendo que as águas adjacentes a estes ambientes e, principalmente aos manguezais, produzem uma elevada carga de material orgânico em suspensão, fornecendo subsídios ideais para o cultivo de moluscos (BRANDINI et al, 2000).

A maior parte da produção maricultora no Brasil (90,0 %) está concentrada na região Sul, no Estado de Santa Catarina que é também o maior produtor de mexilhões da América Latina (PAULILO, 2002; MELO, 2007. O ESTADO DE SÃO

PAULO, CADERNO AGRÍCOLA, 2007). A produção de mexilhões em Santa Catarina cresceu cerca de 1.742 % entre os anos de 1990 a 1995 tendo esta atividade se tornado não somente uma importante fonte de proteínas, mas também de geração de empregos (PAULILO, 2002).

Este enorme crescimento e aceleração da produção maricultora e aquícultora de maneira geral (moluscos, peixes e crustáceos) não se refletem somente no Brasil, mas em todo o mundo (FAO, 2005).

A China é o maior produtor aquícola mundial, mantendo a primeira colocação entre os anos de 1996 a 2005, segundo os dados divulgados da última pesquisa da FAO, (2005) (Anexo 1).

Outros países como a Índia, Vietnã, Indonésia, Tailândia, Bangladesh, Japão, Chile, Noruega e Filipinas também têm destaque no cenário mundial (2<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> colocações respectivamente, referentes ao ano de 2005) (Anexo 1).

O Brasil aparece atrás dos países supracitados e também do Egito, Mianmar, Estados Unidos, República da Coreia, Taiwan e França, estando em posição superior à Espanha, Itália, Malásia, Reino Unido, Canadá, Turquia, México, Irã, Rússia, Grécia, Nova Zelândia e Paquistão (Anexo 1).

No período compreendido de 1996 a 2003, a produção brasileira avançou ano após ano, obtendo em 2003 o seu melhor desempenho e, ocorrendo uma leve queda nos anos subseqüentes (2004 e 2005) (Figura 2).

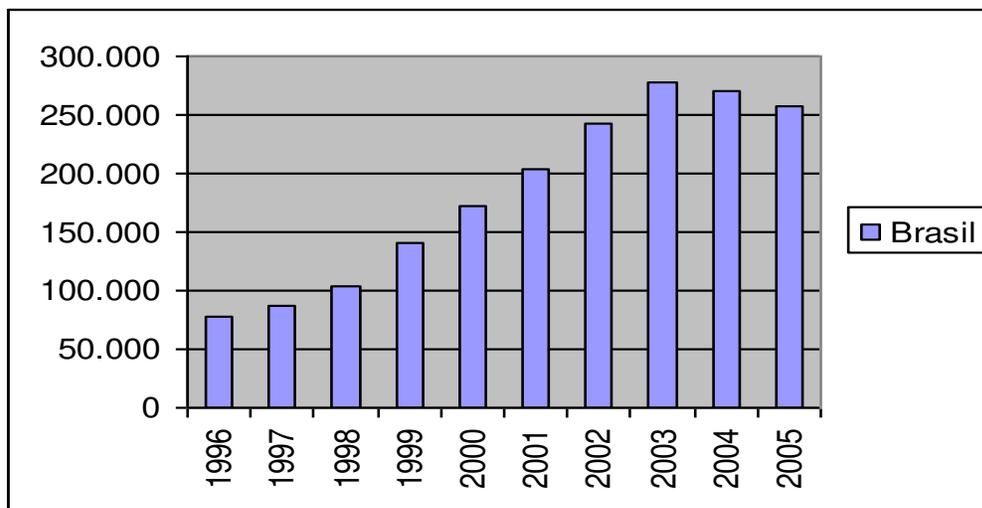


Figura 2: Evolução da produção aquícola brasileira no período entre 1996 a 2005 em relação à quantidade produzida em toneladas (FAO, 2005).

### 2.5.1 Surtos de infecções associados ao consumo de bivalves

Em todo o mundo, o consumo de moluscos bivalves tem aumentado consideravelmente, principalmente nas três últimas décadas. Juntamente com esta tendência, surtos de infecções associados com a ingestão de moluscos consumidos crus ou levemente cozidos, tem sido reportados em praticamente todos os continentes (POTASMAN, 2002).

Os moluscos bivalves são utilizados como fonte de alimento desde as origens do Império Romano e, há mais de 100 anos, a ingestão destes moluscos é reconhecida como causa de surtos de infecções por agentes bacterianos e virais (INGRESSOLL, 1881 *apud* POTASMAN, 2002).

O primeiro surto reconhecido ocorreu em 1816, sendo documentado por um pesquisador francês que descreveu o desenvolvimento de febre tifóide em um

grupo de pessoas que consumiram ostras provenientes de um ambiente contaminado por esgoto (PASQUIER, 1816 *apud* POTASMAN, 2002).

A grande maioria dos surtos de doenças associados ao consumo de moluscos bivalves ocorreu na América do Norte, Ásia, Europa e no continente Australiano, sendo que foram ocasionados principalmente pela ingestão de ostras, seguida de mariscos e mexilhões (POTASMAN, 2002).

O maior surto já noticiado ocorreu em Xangai, na China, no ano de 1988, quando 290.000 pessoas contraíram o vírus da hepatite A, após ingerirem mariscos e 47 pessoas foram a óbito (TANG et al, 1991).

Desde o final do século XIX, somente nos Estados Unidos, mais de 400 surtos, com 14.000 casos foram reportados, relacionados à ingestão de moluscos consumidos crus ou mal-cozidos (RIPPEY, 1994).

No período compreendido entre os anos de 1969 a 2000, muitos outros surtos ocorreram ao redor do mundo, relacionados com diferentes agentes etiológicos (Tabela 3).

O entendimento da fisiologia destes animais explica porque os seres humanos podem contrair diversas doenças ao ingeri-los crus ou parcialmente cozidos: muitas das espécies de bivalves alimentam-se mediante o processo de filtração, realizado pelas brânquias onde grandes volumes de água passam através dessas estruturas por ação ciliar. Quando microrganismos patogênicos como bactérias, vírus e protozoários estão presentes nos locais de coleta e produção destes animais, são filtrados pelas brânquias e aí ficam retidos podendo, posteriormente, também serem encontrados nas glândulas digestivas, em altas concentrações (POTASMAN et al, 2002; SHUMWAY, 1992).

Devido à sua eficiente capacidade filtrante, pois os bivalves podem filtrar de 20 a 100L de água, dependendo de seu tamanho e da espécie (ROBERTSON, 2007), estes animais vêm sendo utilizados há décadas como organismos sentinelas de contaminação aquática também por metais tóxicos e pesticidas (O'CONNOR, 2002).

A sua distribuição mundial, seu modo de vida sedentário e seu comportamento filtrante, susceptível à bioacumulação de poluentes, toxinas e patógenos, fazem destes organismos as espécies ideais para o monitoramento da poluição dos mais diversos ambientes aquáticos (RIPPEY, 1994; SAUVÉ et al, 2002).

**Tabela 3: Surtos de etiologia bacteriana e viral (n = 46), reportados em diversas localidades do mundo e associados com o consumo de moluscos bivalves, no período compreendido entre 1969 a 2000.**

Agente (s) etiológico (s)	Nº. de Surtos	Indivíduos afetados	Países/relato	Moluscos
Calcivírus Norwalk-like vírus	18 <sup>a</sup>	5923	Estados Unidos Reino Unido Austrália Japão Espanha	Mariscos Ostras
Vírus da Hepatite A	8	290.965 <sup>b</sup>	Estados Unidos Itália China Austrália	Mariscos Mexilhões Ostras
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5	669	Estados Unidos Canadá	Ostras mariscos
<i>Vibrio cholera</i>	4	120	Malásia Itália Estados Unidos	Ostras
<i>Vibrio vulnificus</i>	1	72	Estados Unidos	Ostras
<i>Vibrio mimicus</i>	1	17	Estados Unidos	Ostras
<i>Vibrio hollisae</i>	1	2	Estados Unidos	Ostras
<i>Salmonella</i> spp.	3	98	Cingapura Reino Unido Japão	Vôngole Ostras
<i>Shigella flexneri</i>	1	40	França	Mexilhão <sup>c</sup>
<i>Shigella sonnei</i>	1	24	Estados Unidos	Ostras
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2	54	Estados Unidos Canadá	Ostras
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	4	Nova Zelândia	Mexilhão

Fonte: POTASMAN et al, 2002.

a = inclui 3 surtos em que a identificação do patógeno não foi conclusiva, considerado presumivelmente um vírus

b = incluindo os 290.000 mil casos do surto de Xangai

c = relacionado também com a ingestão de camarão

No Brasil, mediante experimentos de contaminação artificial, pesquisadores de Santa Catarina provaram que ostras (*Crassostrea gigas*) foram capazes de acumular o vírus da hepatite A em seus tecidos (COELHO et al, 2003) e Sincero et al. (2006) desenvolveram uma técnica para detectar este mesmo vírus em ostras quando presentes em baixos níveis de contaminação.

Recentemente, a comercialização e consumo de moluscos bivalves, mais precisamente de mexilhões, foi suspensa em Santa Catarina, devido à contaminação dos locais em que estes se encontravam por ficotoxinas após a ocorrência de um surto de diarreia que acometeu dezenas de pessoas (SANTA CATARINA, 2007).

Os estudos acerca da contaminação de moluscos bivalves pelos protozoários patogênicos *Cryptosporidium* e *Giardia* iniciaram-se há pouco mais de uma década, sendo o primeiro relato da ocorrência natural de oocistos de *Cryptosporidium* no ano de 1997 (CHALMERS et al, 1997).

A maioria dos estudos e relatos sobre a ocorrência natural, sobrevivência e potencial de infectividade dos protozoários patogênicos recuperados de moluscos bivalves referem-se ao protozoário *Cryptosporidium* (ROBERTSON, 2007).

Inicialmente, pensou-se em utilizar os moluscos como bioindicadores de protozoários patogênicos, realizando-se um monitoramento biológico dos ambientes aquáticos (marinhos e de água doce) como uma alternativa para a substituição dos métodos padrões de análise de água utilizados até os dias de hoje para este fim, como a filtração em membrana, filtração em cartucho entre outros (ROBERTSON, 2007).

No entanto, posteriormente, a pesquisa de protozoários patogênicos em moluscos bivalves foi focada nas espécies que são destinadas ao consumo humano e a investigação do potencial infectante destes protozoários via o consumo de moluscos.

A bioacumulação de contaminantes e patógenos removidos do ambiente circundante destes animais conferem aos bivalves, uma vez ingeridos crus, a capacidade de atuarem como hospedeiros paratênicos, ao transportarem passivamente os protozoários acumulados em seu corpo (FAYER et al, 1997; GRACZYK et al, 1998).

Os protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* não conseguem se multiplicar no corpo dos bivalves, porém, os mesmos são estáveis quando presentes em seus tecidos e, podem ser acumulados em grandes quantidades (200 mariscos foram capazes de remover e reter em seu corpo 38.000.000 de oocistos de um aquário inoculado com estas formas parasitárias num período de 24h) (GRACZYK et al, 1998).

Diversos estudos demonstraram que os oocistos recuperados dos tecidos dos bivalves (mexilhões, vôngoles, ostras e mariscos) mantiveram sua capacidade infectante inalterada, de acordo com bioensaios utilizando camundongos neonatos (FAYER et al, 1998a; 2002; GÓMES-BAUTISTA et al, 2000; GÓMEZ-COUSO et al, 2003; LI et al, 2006; GRACZYK et al, 2007a).

Além disso, o longo período de persistência e resistência ambiental que estas formas encistadas apresentam (particularmente os oocistos) favorece a manutenção da capacidade infectante, constituindo um risco à saúde pública (TAMBURRINI e POZIO, 1999; GÓMEZ-COUSO et al, 2003).

Embora até os dias de hoje, aparentemente, não se tenham relatos da ocorrência de surtos de protozooses associados à ingestão de moluscos bivalves em todo o mundo, a ocorrência natural de *Cryptosporidium* e *Giardia* já foi reportada em diversos países em diferentes espécies de moluscos bivalves destinados ao consumo humano (Tabela 4) e, existe um consenso entre a comunidade científica dos riscos potenciais da aquisição de protozoários, principalmente por grupos populacionais mais vulneráveis, considerados grupos de risco, como os imunodeficientes (GÓMEZ-COUSO et al, 2003; GRACZYK et al, 2007a).

**Tabela 4: Ocorrência de contaminação natural por *Cryptosporidium* e *Giardia* em diferentes espécies de bivalves comestíveis em diversos países do mundo.**

<b>Ano do relato (Referência)</b>	<b>País</b>	<b>Espécie de molusco</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Espécies de protozoários</b>
CHALMERS et al, 1997	Irlanda	<i>Mytilus edulis</i>	Mexilhão	<i>Cryptosporidium parvum</i>
FAYER et al, 1998a	Estados Unidos	<i>Crassostrea virginica</i>	Ostras	<i>Cryptosporidium parvum</i>
GOMEZ-BAUTISTA et al, 2000	Espanha	<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Cerastoderma edule</i>	Mexilhão Vôngole	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Cryptosporidium parvum</i>
FREIRE-SANTOS et al, 2000b	Espanha, Reino Unido, Itália	<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Venerupis pullastra</i> <i>Venus verrucosa</i> <i>Dosinia exoleta</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Venerupis rhomboideus</i>	Mexilhão Marisco Marisco Marisco Marisco Ostra Marisco	<i>Cryptosporidium</i> spp. Idem Idem Idem Idem Idem Idem
LOWERY et al, 2001	Irlanda do Norte	<i>Mytilus edulis</i>	Mexilhão	<i>Cryptosporidium hominis</i>
FAYER et al, 2002	Estados Unidos	<i>Crassostrea virginica</i>	Ostra	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Cryptosporidium hominis</i> <i>Cryptosporidium baileyi</i>
NEGM, 2003	Egito	<i>Caelatura pruneri</i> <i>Donax trunculus limiacus</i>	Marisco Marisco	<i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Cryptosporidium</i> spp.
GOMEZ-COUSO et al, 2003	Espanha, Portugal, Itália, Reino Unido, Irlanda	<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Dosinia exoleta</i> <i>Cerastoderma edule</i> <i>Ruditapes decussatus</i> <i>Venerupis pullastra</i>	Mexilhão Marisco Ostra Marisco Vôngole Marisco Marisco	<i>Cryptosporidium</i> spp. Idem Idem Idem Idem Idem Idem
FAYER et al, 2003	Estados Unidos, Canadá	<i>Crassostrea virginica</i> (espécies não relatadas)	Ostra Mariscos	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Cryptosporidium hominis</i> , <i>Cryptosporidium meleagridis</i>

GOMEZ-COUSO et al, 2004	Espanha, Reino Unido, Itália, Irlanda, Nova Zelândia	<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Dosinia exoleta</i> <i>Cerastoderma edule</i> <i>Venerupis pullastra</i> <i>Venerupis rhomboideus</i> <i>Venus verrucosa</i> <i>Perna canaliculus</i>	Mexilhão Marisco Ostra Marisco Vôngole Marisco Marisco Marisco Mexilhão	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Cryptosporidium hominis</i> , <i>Giardia duodenalis</i> (grupo B)
GÓMEZ-COUSO et al, 2005a	Espanha	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mexilhão	<i>Giardia</i> spp.
MILLER et al, 2005b	Estados Unidos	<i>Mytilus californianus</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mexilhão Mexilhão	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Cryptosporidium felis</i> , <i>Cryptosporidium andersoni</i>
GIANGASPERO et al, 2005	Itália	<i>Chamelea gallina</i>	Marisco	<i>Cryptosporidium parvum</i>
LI et al, 2006	França	<i>Mytilus edulis</i>	Mexilhão	<i>Cryptosporidium parvum</i>
GOMEZ-COUSO et al, 2006a	Espanha	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mexilhão	<i>Cryptosporidium parvum</i>
SCHETS et al, 2007	Holanda	<i>Crassostrea gigas</i>	Ostra	<i>Giardia</i> spp. <i>Cryptosporidium</i> spp.
GRACZYK et al, 2007a	Estados Unidos	<i>Crassostrea virginica</i>	Ostra	<i>Cryptosporidium parvum</i>
LEAL et al, 2008	Brasil	<i>Crassostrea rhizophorae</i> <i>Tivela mactroides</i>	Ostra Vôngole	<i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Cryptosporidium</i> spp.

---

## 2.5.2 Métodos para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em moluscos bivalves<sup>1</sup>

A pesquisa de oocistos e cistos de protozoários patogênicos em tecidos de bivalves é um processo tecnológico altamente complexo. Para se chegar à detecção precisa destes agentes parasitários em qualquer tipo de amostra ambiental, são necessários não somente equipamentos e ferramentas adequadas, mas também deve-se contar com recursos humanos devidamente capacitados. Entre as competências necessárias, deve-se ressaltar a importância do conhecimento da biologia e morfologia das formas parasitárias pelos indivíduos envolvidos na detecção de protozoários em amostras ambientais.

Em relação às metodologias utilizadas para o processamento dos exemplares de moluscos, a técnica mais difundida mundialmente baseia-se na análise de tecidos específicos, tais como as brânquias, trato gastrointestinal ou hepatopâncreas e a hemolinfa. Grande parte dos pesquisadores trabalha com a análise de brânquias e trato gastrointestinal, a partir de macerados teciduais analisando alíquotas destes e empregando a reação de imunofluorescência direta (RID) com anticorpos monoclonais para a visualização de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*<sup>(11,17,46,47)</sup>.

Utilizando a RID e técnicas moleculares, oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados nas estruturas branquiais de ostras e mariscos, coletados de 37 pontos em 13 estados da Costa Atlântica dos Estados Unidos (Maine até a Flórida) e também de uma província canadense<sup>(48)</sup>.

---

<sup>1</sup> Capítulo de artigo de revisão aceito para publicação pela Revista Pan Americana de Infectología (anexo 2).

Neste estudo, os autores removeram as brânquias dos animais e estas, foram levadas ao vórtex, em solução salina de Hanks.

O líquido resultante da lavagem destas estruturas foi posteriormente examinado, verificando-se que em 64,9% dos pontos estudados ao longo da costa Atlântica, os moluscos apresentavam oocistos.

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* também foi reportada em outras regiões da América do Norte e Europa, com o emprego da técnica de análise de homogenados brânquias, intestinais e de lavados branquiais de diferentes espécies de moluscos (*Crassostrea virginica*, *Mytilus galloprovincialis*, *Ruditapes philipinarum*, *Ostrea edulis*, *Venus verrucosa*, *Dosinia exoleta*, *Venerupis pullastra*, *Venerupis rhomboideus*)<sup>(46,49)</sup>.

Cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados nos Países Baixos em homogenados intestinais de ostras (*Crassostrea gigas*) empregando a RID<sup>(19)</sup>.

A hemolinfa está presente em grande quantidade nos músculos adutores dos bivalves (estes músculos são importantes, pois conferem resistência e proteção aos animais)<sup>(50)</sup>. Oocistos também podem ser detectados na hemolinfa. Por exemplo, na Itália, oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em concentrações de 14 a 30 oocistos/ml do fluido circulatório do molusco<sup>(51)</sup>. Entretanto, de acordo com alguns autores, a hemolinfa não deve ser examinada quando se empregam ensaios de imunofluorescência direta uma vez que os hemócitos presentes neste tecido exibem uma fluorescência própria, dificultando a visualização dos oocistos e gerando resultados falsos positivos<sup>(52)</sup>.

A reação de cadeia de polimerase (PCR) tem sido empregada em pesquisa científica para a confirmação e classificação de espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* em tecidos de mariscos<sup>(53,54,55)</sup>.

Gómez-Couso et al.<sup>(53)</sup> avaliaram a contaminação natural para ambos os protozoários em ostras, mexilhões, vôngoles, vieiras e outros mariscos provenientes da Espanha e do Reino Unido. Do total de 87 moluscos bivalves examinados, 24 apresentaram contaminação por *Cryptosporidium parvum* e uma amostra apresentava *Cryptosporidium hominis* assim como também foi detectada positividade para *Giardia duodenalis*, pertencente à assembléia B em uma amostra.

A separação imunomagnética (IMS) é um procedimento de captura das partículas-alvo que vem sendo gradativamente aplicado às amostras ambientais, especialmente quando há um grande número de partículas, microrganismos e sujidades. A IMS é uma etapa de purificação que confere uma maior sensibilidade para a recuperação de cistos e oocistos. A técnica é baseada na adição de microesferas magnetizadas e recobertas com anticorpos anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* à amostra a ser analisada, promovendo a captura e isolamento de cistos e oocistos de partículas interferentes. Esta técnica pode ser usada em combinação com a RID e o PCR<sup>(56)</sup>, porém ela apresenta um custo mais elevado, cerca de 50 dólares por teste, excetuando-se os custos iniciais de implantação desta metodologia (3.567 dólares).

Comparando-se as técnicas de separação imunomagnética, imunofluorescência direta e PCR para a detecção de cistos e oocistos em tecidos de moluscos bivalves, mesmo presentes em baixos níveis de contaminação, Miller

et al.<sup>(52)</sup> constataram que a separação imunomagnética, seguida da reação de imunofluorescência direta, foi a técnica mais sensível.

Mais recentemente as técnicas de hibridização *in situ* e PCR foram empregadas para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em tecidos de bivalves<sup>(45)</sup>.

No Brasil e na América Latina, o primeiro relato da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em moluscos bivalves destinados ao consumo humano, foi reportado por Leal et al.<sup>(57)</sup> em ostras e vôngoles coletados de seu ambiente natural em uma praia do Litoral Norte de São Paulo. Estes autores encontraram o protozoário em homogenados teciduais dos mariscos, empregando-se a RID, microscopia de contraste de fase e incorporação de corante vital (DAPI) como ferramentas auxiliares na confirmação dos caracteres morfológicos típicos do protozoário.

Contudo, considerando-se a realidade econômica latino-americana, é imprescindível buscar metodologias que apresentem menor custo, mas que sejam reprodutíveis e apresentem boa sensibilidade.

Leal et al.<sup>(58)</sup> padronizaram uma técnica para recuperar oocistos de *Cryptosporidium* a partir de homogenados teciduais de ostras e vôngoles expostos à água do mar, contaminada artificialmente, em um aquário com capacidade de 10 litros. Os moluscos foram mantidos no aquário, sob estas condições durante 24 horas e, após este período de exposição, foram removidos do aquário, abertos e as brânquias e trato-gastrointestinal de 20 animais seccionados e homogeneizados em macerador de tecidos.

Alíquotas dos tecidos foram examinadas por meio da RID para a visualização dos protozoários e, ambas as espécies de moluscos bivalves removeram com eficácia grande parte dos oocistos da água do aquário.

Entretanto, os tecidos dos moluscos contêm muitos lipídeos e seu excesso é um fator que interfere diretamente na visualização dos parasitos nos tecidos dos bivalves. Para a remoção de lipídeos alguns autores utilizam a centrifugação com éter-etílico<sup>(11,46)</sup>. Leal et al.<sup>(58)</sup> introduziram uma etapa de lavagem e homogeneização onde o trato gastrointestinal e as brânquias dos bivalves foram macerados com uma solução contendo um surfactante o qual complementa a ação do éter após centrifugação, removendo de forma efetiva uma considerável quantidade de gordura, melhorando a visualização das formas parasitárias durante a RID.

### **2.5.3 Normas de controle para a criação e comercialização de moluscos bivalves no Brasil <sup>2</sup>**

No Brasil, a resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) Nº. 357 de 17 de Março de 2005<sup>(59)</sup> estabelece padrões para o cultivo de moluscos bivalves destinados a alimentação humana em águas salinas e salobras. Ressalte-se que apenas a pesquisa de indicadores bacteriológicos nas águas em que estes são cultivados é contemplada.

De acordo com esta resolução, a média geométrica de coliformes termotolerantes (de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local) não deverá exceder 43 por 100 mililitros de amostra de água analisada.

Esta legislação aplica-se aos locais de cultivo de ostras e mariscos, como as fazendas de maricultura; entretanto, estas podem não estar livres da contaminação por protozoários patogênicos uma vez que alguns estudos apontaram que o monitoramento de bactérias indicadoras de contaminação fecal não é suficiente para assegurar a qualidade e a segurança quanto à contaminação por protozoários neste tipo de alimento<sup>(11,60)</sup>. Na Holanda, bem como nos Estados Unidos, oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* foram encontrados nas águas em que os animais vivem, porém não foram encontradas correlações entre a presença de indicadores fecais na água e a ocorrência destes protozoários nos animais coletados<sup>(19,45)</sup>.

---

<sup>2</sup> Capítulo de artigo de revisão aceito para publicação pela Revista Pan Americana de Infectología (Anexo 2).

Diversas espécies de moluscos, cultivados na região da Galícia (Espanha), foram examinados para a presença de protozoários patogênicos e mais de 40% dos animais continham oocistos de *Cryptosporidium* infectantes em seus tecidos; embora a concentração de coliformes fecais (neste caso nos tecidos dos animais) estava de acordo com os padrões exigidos pela legislação do país<sup>(11)</sup>.

A região da Galícia é uma das maiores produtoras de mexilhões do mundo, sendo esta a mais importante área de coleta e produção destes bivalves destinados ao consumo humano na Espanha. Cistos de *Giardia* foram encontrados em 41,8% dos animais analisados provenientes de fazendas de maricultura e o mais alarmante é que a análise da água dos rios que desembocam nesta área, bem como do esgoto tratado e bruto, revelaram altos níveis de contaminação por cistos<sup>(17)</sup>.

A produção de moluscos no Brasil será rastreada com a implantação do Programa Nacional de Controle Higiênico e Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) coordenado pela Secretária Especial de Aqüicultura e Pesca, visando regular a cadeia de produção de moluscos no país<sup>(6)</sup>, desde a área de colheita até os procedimentos de depuração, processamento, distribuição e comércio incluindo o ponto de venda.

As fazendas de maricultura do país somente têm autorização do Serviço de Inspeção Federal (SIF) para trabalhar com ostras vivas, separadas por tamanho e depuradas. Para isso os animais são colocados em água filtrada e esterilizada por aparelhos ultravioleta para eliminar as impurezas, permanecendo neste processo durante 3 a 8 horas<sup>(6)</sup>. Entretanto, considerando a contaminação por protozoários

patogênicos, pesquisas científicas constataram que a depuração, no caso de oocistos de *Cryptosporidium*, foi ineficaz<sup>(11)</sup>.

Pesquisadores espanhóis verificaram que 46.2% dos animais submetidos a depuração por 6 dias (assim como animais submetidos ao processo de depuração por 8 a 14 dias), ainda continham oocistos do protozoário em seus tecidos e, independentemente do tempo de depuração, 50% das amostras contaminadas continham oocistos que mantiveram a sua capacidade infectante inalterada<sup>(11)</sup>. Por outro lado, outros pesquisadores demonstraram que oocistos de *Cryptosporidium* removidos de um aquário e acumulados nos tecidos de mexilhões, eram eliminados no ambiente após 48 horas e apontaram que o tempo de depuração de 72 horas ou mais, seria suficiente para remover totalmente estes estágios parasitários dos moluscos<sup>(61)</sup>.

Entretanto, deve-se ressaltar que os oocistos eliminados no ambiente pelos moluscos, podem ser removidos e acumulados por outros organismos da mesma espécie ou de espécies diferentes, mas co-existentes o que contribui para a dispersão da contaminação<sup>(62)</sup>.

Oocistos de *Cryptosporidium* experimentalmente presentes em tecidos de mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*), que foram cozidos no vapor, mantiveram sua capacidade infectante inalterada, como comprovado por bioensaio empregando camundongos neonatos<sup>(63)</sup>.

Na cidade de Caraguatatuba, (Litoral Norte do Estado de São Paulo) a população autóctone coleta grandes quantidades de vôngoles para a sua subsistência e, dependendo da forma como esse alimento é preparado (se apenas parcialmente cozido ou submetido ao cozimento sob a forma de vapor) oocistos

eventualmente presentes podem continuar infectantes para o ser humano, representando um risco potencial à saúde humana.

Sumarizando, é extremamente importante que a pesquisa sobre a ocorrência dos protozoários patogênicos em moluscos destinados à alimentação humana bem como nos locais onde os mesmos são cultivados ou extraídos, seja contemplada e inserida no programa de controle nacional dos moluscos bivalves.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo principal:

- Detectar a contaminação natural por oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) mediante o exame de tecidos e, em água marinha e de rio que formam um ambiente de estuário, no litoral norte do Estado de São Paulo, durante o período de 1 ano.

#### Objetivos específicos:

- Avaliar a qualidade das águas estuarinas através de análises microbiológicas, parasitológicas e monitoramento de fatores físico-químicos.

- Verificar se existe correlação entre os fatores climáticos como (precipitação e temperatura), os fatores físico-químicos da água como (pH e salinidade) e microbiológicos com a ocorrência de cistos/ooocistos na região estuarina.

- Realizar estudo de correlação entre a qualidade das águas e a eventual contaminação dos moluscos bivalves presentes na região de estuário.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Caracterização e critérios de escolha do local da coleta**

As coletas foram realizadas na cidade de Caraguatatuba, Litoral Norte do Estado de São Paulo, na praia do Camaroeiro (“23° 37’ 49197” S e 45° 23’ 91829”) (Figura 3) região central da cidade com periodicidade mensal.

A praia do Camaroeiro (Figuras 4 e 5) foi escolhida por conter emissários de esgotos que desembocam em riachos e carregam águas do rio Ipiranga para o mar com pequeno trecho caracterizando uma vegetação de mangue (Figura 6).

Esta área também é propícia para a pesquisa porque conta com a presença de entrepostos que comercializam a venda de mariscos e peixes, que atendem a população local e visitante. Além disso, nesta praia não é realizado o monitoramento semanal de bactérias indicadoras de contaminação fecal, realizado pela CETESB, com a finalidade de divulgar os padrões de balneabilidade destas áreas recreacionais para os banhistas.

Foi escolhido um ponto de coleta dos animais (no costão rochoso) onde existe a presença do rio Ipiranga, o qual recebe despejo de esgoto doméstico e desemboca no mar sem nenhum tipo de tratamento, exatamente onde ocorre a confluência das águas durante o dia, quando a maré sobe (Figura 7). As coletas de água, mar e rio foram realizadas separadamente por volta das 12:00h.

Durante todo o ano de coleta, o material foi transportado para o Laboratório de Protozoologia da Unicamp, sendo a triagem dos animais e processamento de parte das amostras hídricas realizadas no mesmo dia da coleta.

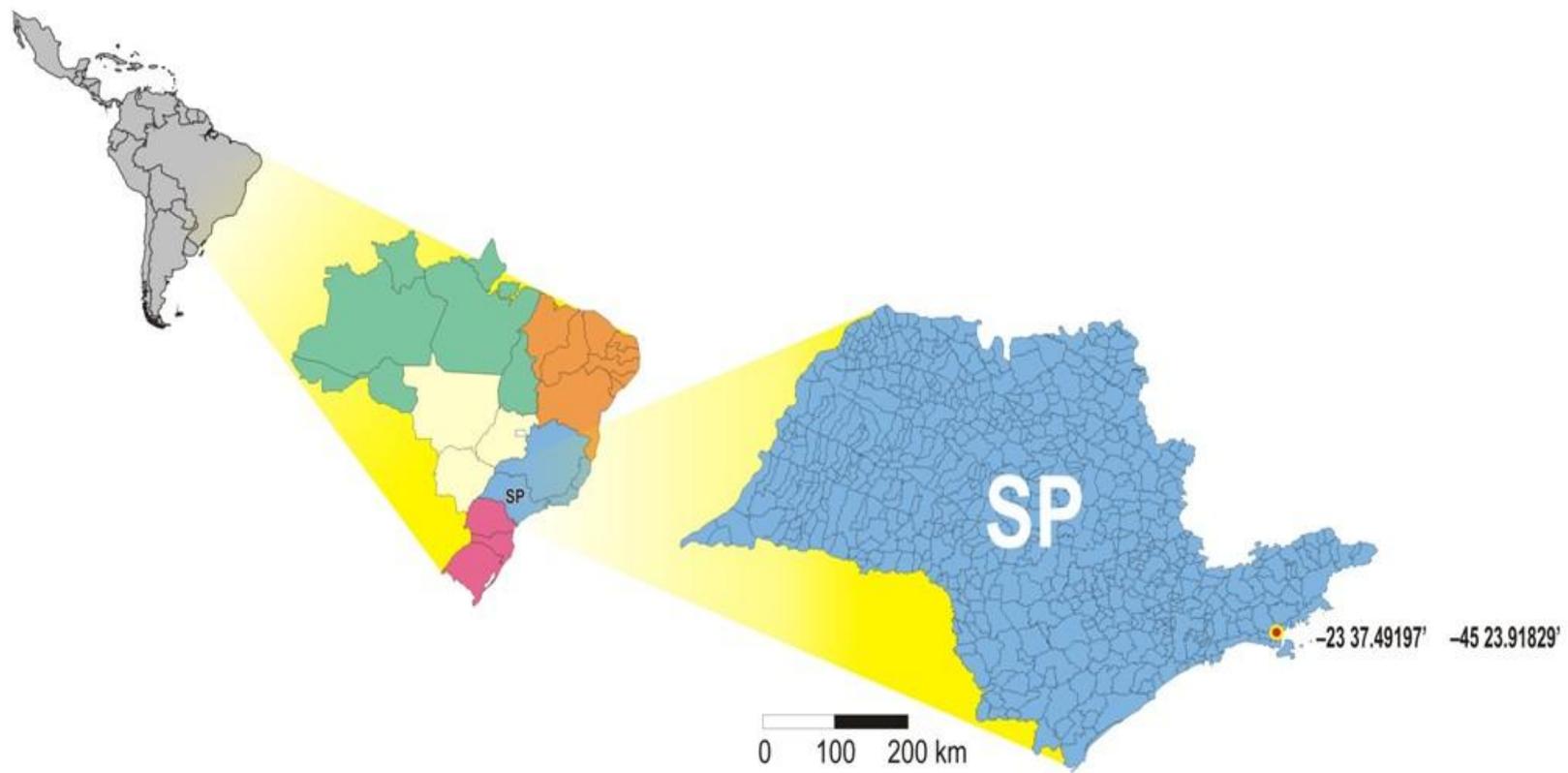


Figura 3: Localização do ponto de coleta das amostras na praia do Camaroeiro, Litoral Norte de São Paulo.



Figura 4: Praia do Camaroeiro – Caraguatatuba - São Paulo.



Figura 5: Praia do Camaroeiro – Caraguatatuba – São Paulo.



Figura 6: Rio Ipiranga desaguando no mar na praia do Camaroeiro (seta branca: local de coleta da água do rio; seta preta: local de coleta da água do mar).



Figura 7: Confluência da água do rio e do mar e ponto de coleta das ostras.

## 4.2 Coleta dos exemplares de moluscos

Foram coletados mensalmente 10 exemplares *in natura*, de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) (Figura 8), sendo o tamanho dos animais de 3 a 6 cm.

Diversos fatores foram enumerados para a escolha deste bivalve como bioindicador entre eles: *i*- por apresentar uma grande capacidade de filtração da água marinha, *ii*- sua localização na área costeira, *iii*- por serem muito resistentes às condições adversas, *iiii*- por serem encontrados durante todo o ano em seu habitat natural e também por serem comumente ingeridos crus.

As coletas foram feitas manualmente sendo as ostras escolhidas ao acaso e retiradas de seu substrato com auxílio de ferramentas como facas e martelo. Os exemplares foram acondicionados em sacos plásticos limpos e descontaminados e transportados, imediatamente após a coleta, em caixas de isopor, refrigeradas, até o laboratório de Protozoologia do Departamento de Parasitologia da Unicamp para análise posterior.



Figura 8: Ostra (*Crassostrea rhizophorae*).

### **4.3 Verificação da contaminação natural nas diferentes amostras**

#### **4.3.1 Exame parasitológico dos bivalves**

Esse procedimento foi realizado de acordo com Leal et al, 2005.

Durante 12 meses, 10 ostras foram examinadas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* nos tecidos dos animais (Fluxograma 1). Os moluscos bivalves foram medidos com um paquímetro e as conchas dos animais foram abertas com o auxílio de ferramentas.

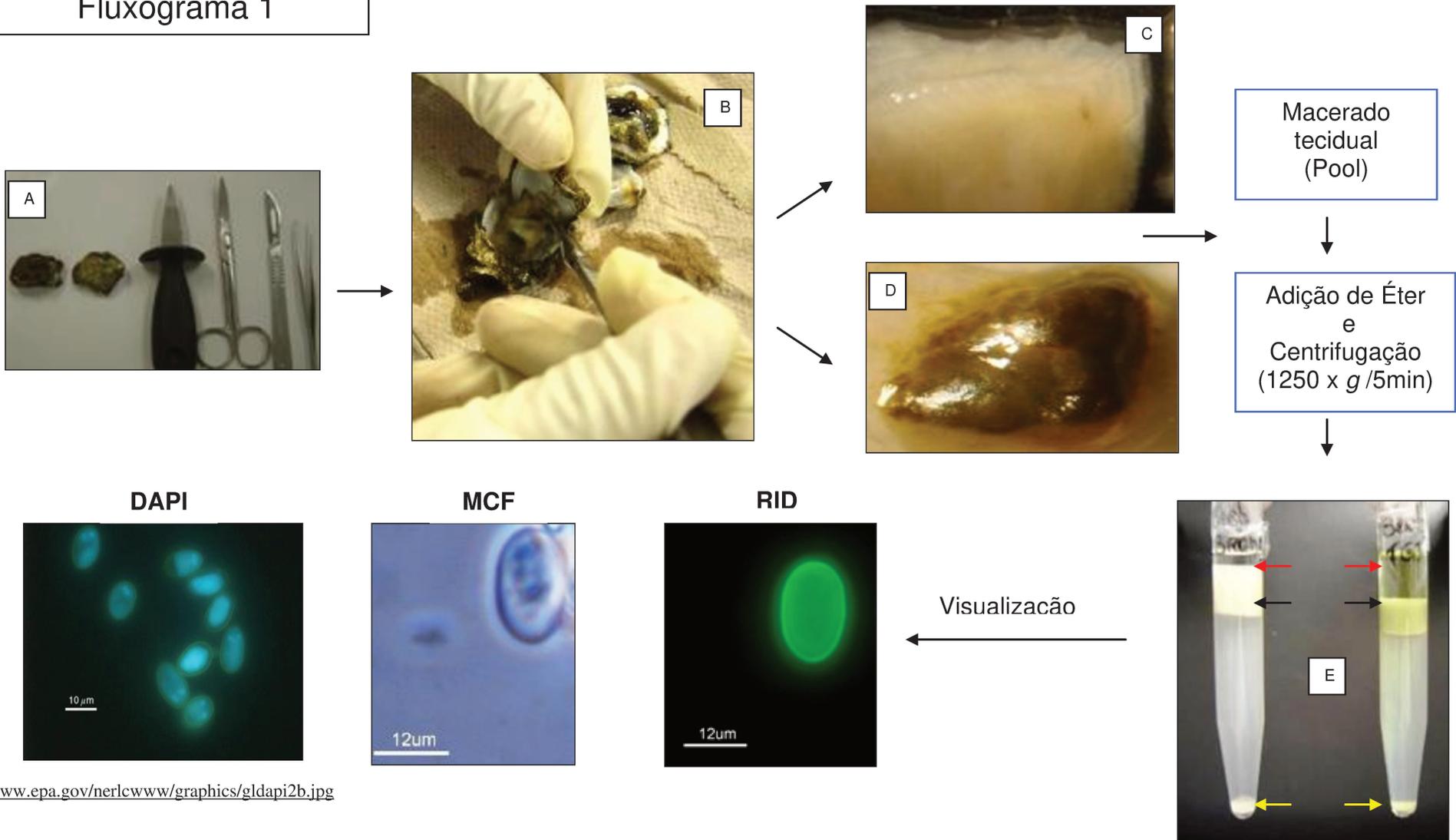
Após desligamento dos músculos adutores dos animais, as brânquias e o trato gastrointestinal ou hepatopâncreas destes animais foram seccionados e colocados separadamente em tubos de centrífuga de 15mL. Ao “pool” tecidual formado adicionou-se água destilada contendo o surfactante Tween 80 (0,1%) na proporção de 2:1.

Efetou-se um macerado em homogeneizador de tecidos até formar uma suspensão. Após a adição de 4mL de éter etílico refrigerado e agitação manual vigorosa por 30 segundos, o volume do tubo de centrífuga foi completado com PBS estéril (0,04M; pH 7.2) e os homogenados submetidos à centrifugo-concentração a 1250 x *g* por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento armazenado em tubos de microcentrifuga. Posteriormente, uma alíquota de 10µL de cada tecido foi analisada por reação de imunofluorescência direta (RID), utilizando-se um Kit comercial da marca Merifluor<sup>®</sup> (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio) empregando-se anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), direcionados contra os epítomos da parede dos cistos e oocistos dos protozoários.

As formas parasitárias foram confirmadas com o emprego do corante vital DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) (Sigma Chemical<sup>®</sup>) que mostra, quando incorporado, a posição e o número de núcleos existentes nos cistos e oocistos e, com auxílio da microscopia de contraste de fase (MCF).

## Fluxograma 1



[www.epa.gov/nerlcwww/graphics/gldapi2b.jpg](http://www.epa.gov/nerlcwww/graphics/gldapi2b.jpg)

**Processamento dos bivalves e visualização de *Cryptosporidium* e *Giardia*.** **A.** Materiais utilizados para abertura dos animais; **B.** Desligamento dos músculos adutores e remoção dos tecidos alvo; **C e D.** Brânquias e trato gastrointestinal (TGI) visualizados em microscópio estereoscópico; **E.** Tecidos submetidos à centrifugação com éter-PBS; as setas amarelas representam os sedimentos analisados por RID, brânquias (tubo esquerdo) e trato gastrointestinal (tubo direito); as pretas representam o muco dos tecidos; setas vermelhas: quantidade de lipídeos presentes nos tecidos.

#### 4.3.1.1 Cálculo do número de oocistos e cistos encontrados por animal

A estimativa do número de protozoários presentes por animal foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$X = \frac{A}{K} \times \frac{C}{D} \quad (a)$$

X = Número de formas parasitárias encontradas por animal

A = Número de oocistos ou cistos visualizados no poço da lâmina do “pool” tecidual analisado

K = 10 (Volume do sedimento examinado no poço = 10µL)

C = Volume total do pellet tecidual (em que foi detectado positividade para as formas parasitárias)

D = Número de animais no “pool”

#### 4.3.2 Coleta e exame da água marinha e de rio para a pesquisa dos protozoários parasitos *Cryptosporidium* e *Giardia*

Foram coletados volumes de 10L de água marinha em galões previamente tratados com solução surfactante, a aproximadamente 30 cm de profundidade e 10L de água superficial de rio da praia selecionada, para análise posterior em laboratório.

As amostras de água do mar e rio foram processadas pela técnica de filtração em membrana de ésteres mistos de celulose (47 mm de diâmetro, porosidade nominal de 3µm marca Millipore®) de acordo com Franco et al., 2001

(Fluxograma 2). O sistema de filtração utilizado foi a bomba de vácuo ajustada a um fluxo de 0,4 a 4 l/min e porta-filtro Gelman<sup>®</sup>.

Após a filtração, as diversas membranas foram cuidadosamente retiradas e colocadas em placas plásticas estéreis para realizar a etapa de recuperação de cistos e oocistos eventualmente presentes nas amostras. Para tanto, a superfície das membranas foi raspada durante 10 minutos com alça plástica macia seguida de lavagens manuais (10 minutos) com solução surfactante (Tween 80, 0,1%) (Figura 9).

O líquido resultante da etapa de eluição foi transferido para tubos cônicos e concentrado por centrifugação ( $1.050 \times g$  por 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante lavado em água Milli Q e, novamente submetido à centrifugação, nas mesmas condições. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento desta segunda centrifugação foi transferido para tubos de microcentrifuga e mantido sob refrigeração à 4°C até a realização da RID.

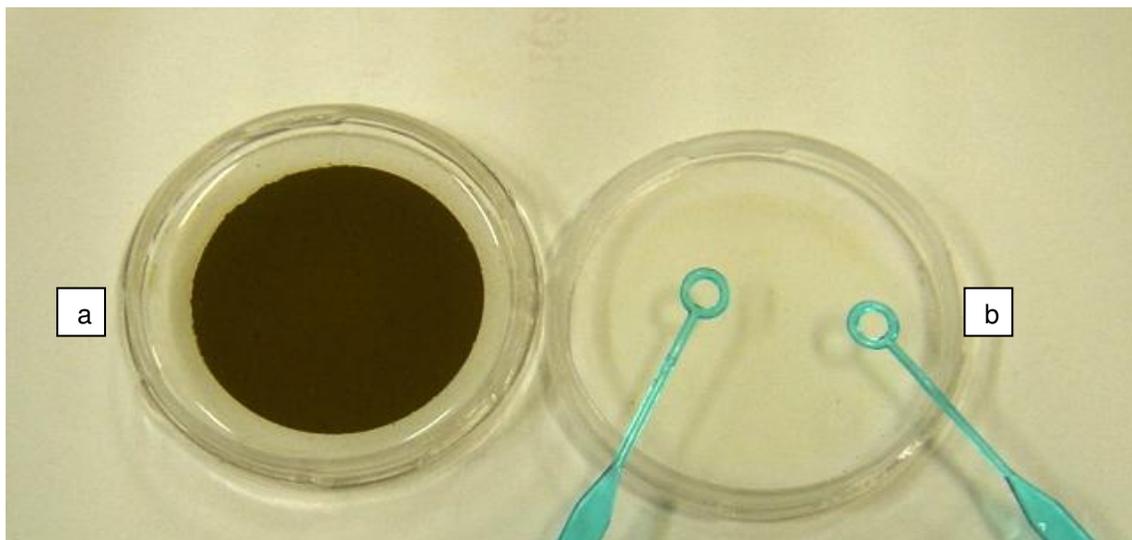
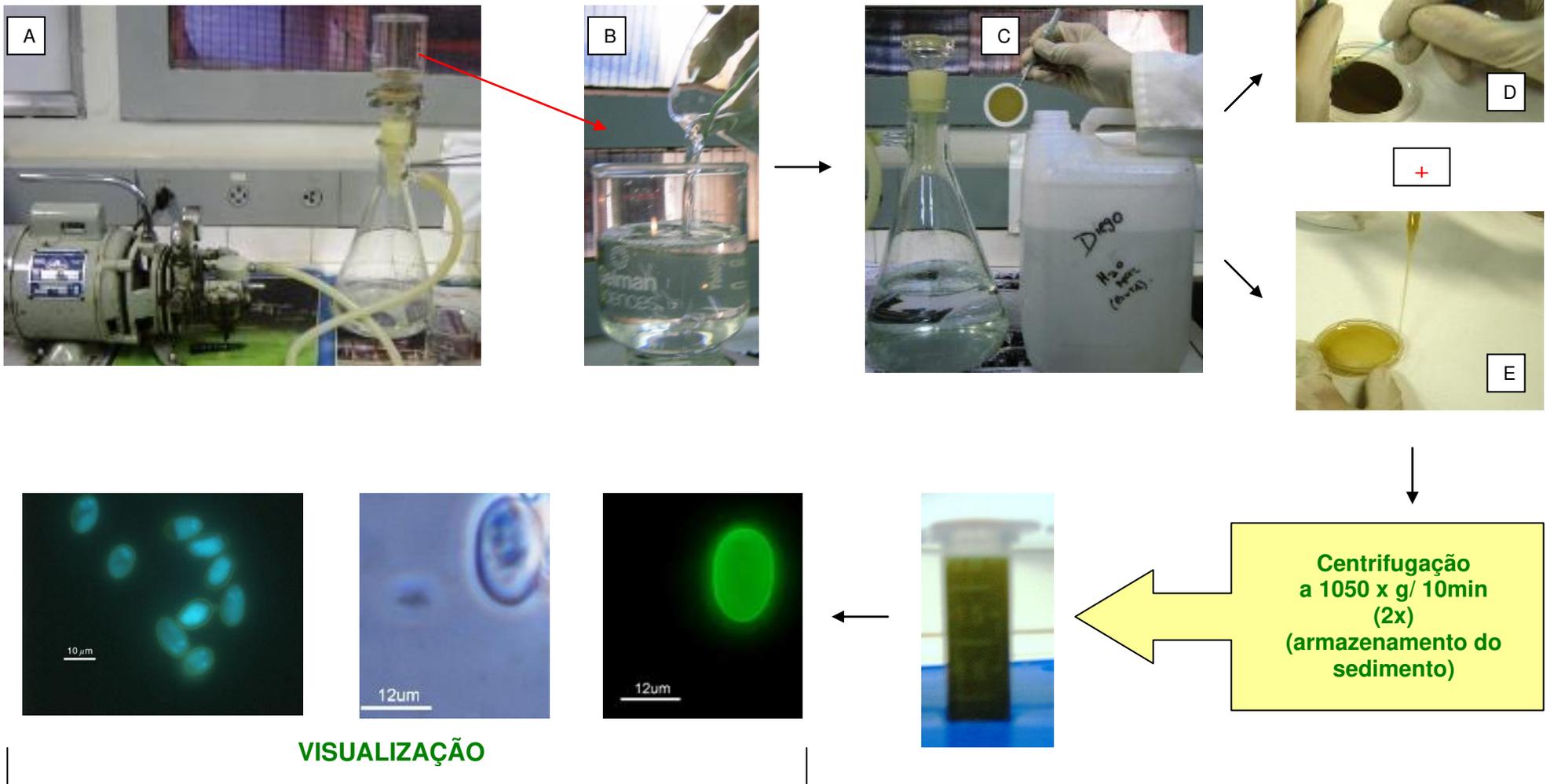


Figura 9: Etapa de eluição das membranas: (a) antes e (b) após raspagem e lavagem

## Fluxograma 2



**Processamento das amostras hídricas (rio e mar) pela técnica de filtração em membranas e visualização de *Cryptosporidium* e *Giardia*.**  
A. Equipamento utilizado para a filtração da água, com bomba de vácuo e porta filtro contendo a membrana. B. Amostra sendo despejada no porta filtro. C. Membrana removida do porta filtro após etapa de filtração. D. Raspagem da membrana com alças plásticas. E. Lavagem da membrana

#### 4.3.2.1 Cálculo do número de oocistos e/ou cistos encontrados por litro na água do rio e na água marinha em situação natural de contaminação

A estimativa do número de cistos e oocistos presentes por litro de água examinada foi calculada da seguinte forma:

$$X = \frac{n}{K} \times \frac{S}{A} \quad (b)$$

Onde:

X = Concentração de cistos e oocistos/L

n = número de oocistos ou cistos visualizados no poço da lâmina

K = 10 (Volume do sedimento examinado no poço = 10µL)

S = Volume total do sedimento obtido (µL)

A = Volume filtrado da amostra (L)

#### 4.4 Medição de fatores abióticos das amostras de água

Em cada coleta, foram analisados e medidos os seguintes parâmetros separadamente na água marinha e na água do rio: **Temperatura e pH**- estes dados foram obtidos utilizando um medidor com multisensor da marca Corning Incorporated-Check Mate<sup>®</sup>. As medições foram feitas na praia, no momento da coleta das amostras; - **Salinidade**: as diversas amostras de água coletadas foram transportadas refrigeradas até a cidade de Campinas e as medições de salinidade foram efetuadas na Pontifícia Universidade Católica de Campinas, com o auxílio do aparelho Horiba U10; - **Precipitação**: os dados foram obtidos junto à base de

dados disponíveis on-line no Sistema de Monitoramento Agrometeorológico (AGRITEMPO, 2008).

Todos os valores foram tabulados mês a mês, para posterior análise de eventual associação e correlação entre estas variáveis e a ocorrência dos protozoários nas águas analisadas e a contaminação dos moluscos.

#### **4.5 Análise microbiológica das amostras de água**

As amostras de água foram coletadas em recipientes previamente esterilizados, para a realização de análise de índice de bactérias indicadoras de contaminação fecal: coliformes totais, coliformes termotolerantes, estreptococos, enterococos e *Escherichia coli*, conforme padrões descritos em STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (2005), objetivando avaliar a presença de contaminação das amostras hídricas e determinar a qualidade microbiológica do ambiente marinho e da água doce. Para tanto, utilizou-se a técnica dos tubos múltiplos, onde os indicadores são estimados por N.M.P. (número mais provável).

Os valores foram tabulados mês a mês para posterior verificação de eventual associação e correlação entre estes indicadores e a ocorrência dos protozoários nas águas analisadas e a contaminação dos moluscos.

## **4.6 Experimentos em condições de contaminação artificial**

### **4.6.1 Enumeração de oocistos e cistos (controle positivo)**

Para determinar a densidade de oocistos a ser utilizada nos experimentos de contaminação artificial (controle positivo), foi realizado um inóculo, onde 100µL da suspensão de protozoários presentes no Kit da marca Merifluor (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio) preservados em solução de formalina 10%, foi diluído em 900µL de água Milli Q em um tubo de microcentrífuga.

A enumeração de oocistos e cistos foi feita diretamente nos poços da lâmina de imunofluorescência, objetivando-se saber o número de protozoários presentes em 5µL no inóculo preparado. Para tanto, este procedimento foi realizado por três observadores, de maneira independente, sem que tivessem conhecimento prévio do valor obtido por cada um, em triplicatas e o valor médio das leituras considerado para o cálculo da dose de oocistos e cistos a serem utilizados nos experimentos controles.

### **4.6.2 Experimento controle positivo para a água marinha.**

Com a finalidade de avaliar a sensibilidade da metodologia aplicada para as amostras de água marinha coletadas, três experimentos-controle foram conduzidos paralelamente à análise das amostras examinadas para a contaminação natural. Desta forma, 10L de água marinha foram coletados e transportados para o laboratório, sendo que a água utilizada neste experimento foi a mesma do ponto em que se verificava a análise da presença de contaminação ambiental por protozoários.

Um número conhecido de cistos e oocistos foi utilizado para contaminar um galão contendo 2 litros da amostra de água. Os protozoários foram deixados em contato com a água marinha durante 2 horas. Após este período, todo o volume de água inoculado foi filtrado, utilizando-se a mesma técnica já descrita para o processamento das amostras naturais de água (item 4.3.2).

Os protozoários visualizados no poço da lâmina de imunofluorescência foram contados e a eficiência de recuperação para cada parasito calculada, sendo que para se estimar com precisão a sensibilidade da metodologia no ensaio controle, ambas as amostras (natural e artificialmente contaminada) foram analisadas. O cálculo da sensibilidade da metodologia obedeceu a seguinte fórmula:

$$S = \frac{A - B}{C} \quad (c)$$

Onde:

S = Sensibilidade da metodologia

A = Número de oocistos e cistos visualizados na água contaminada artificialmente

B = Número de oocistos e/ou cistos visualizados na água bruta

C = Número de oocistos e/ou cistos esperados em 10 $\mu$ L

### **4.6.3 Experimento controle positivo dos invertebrados**

#### **4.6.3.1 Coleta dos animais e da água marinha para o experimento de contaminação artificial**

Para os experimentos de contaminação artificial dos moluscos, em laboratório, foi coletado um volume de 20 litros de água marinha e 10 ostras da mesma praia em que os animais foram coletados, com o intuito de refletir, de maneira mais fidedigna, as condições ambientais em que os mesmos estavam submetidos. As amostras de água marinha foram devidamente acondicionadas e transportadas sob refrigeração.

Os bivalves foram mantidos e transportados em sacos limpos e descontaminados, contendo água do mar, visando o experimento de contaminação artificial em aquário, conforme descrito a seguir.

#### **4.6.3.2 Depuração dos animais em aquário e contaminação artificial**

Previamente à inoculação das formas parasitárias na água marinha do aquário (contendo os animais), foram realizados experimentos de depuração com a finalidade de eliminar oocistos e cistos que eventualmente foram filtrados e acumulados nos tecidos dos animais, oriundos da contaminação da praia por esgoto (Fluxograma 3). Para tanto, previamente ao seu acondicionamento no aquário, o volume de 5L de água do mar foi filtrado em membrana de ésteres mistos de celulose (porosidade nominal de 3 $\mu$ m, diâmetro de 47 mm) com bomba à vácuo, de acordo com o item 4.3.2

Condições de aeração contínua e circulação da água dos aquários mediante bomba de ar foram mantidas durante todo o experimento-controle.

Fatores como temperatura e salinidade da água do mar foram monitorados e mantidos constantes durante todos os dias do procedimento de depuração dos animais.

Os animais foram colocados no primeiro aquário (AQ 1) e deixados durante 41h. Após este período, a água do aquário que continha os animais sofreu nova filtração sendo que as membranas resultantes desta filtração foram processadas por eluição e extração mecânica como já descrito no item 4.3.2 e, o sedimento armazenado para posterior análise por imunofluorescência direta objetivando a pesquisa destes protozoários na água do primeiro dia de acondicionamento dos animais.

Em seguida, mais 5L de água marinha foram filtrados e despejados em um novo aquário (AQ 2). Os animais foram transferidos para o AQ 2 e deixados por 26h. Após este período, a água do aquário do segundo dia de acondicionamento foi submetida à análise de protozoários patogênicos e os animais transferidos para um novo aquário (AQ 3), onde previamente 5L de água do mar já havia sido filtrada para a introdução dos animais.

Após 26 horas, a água do aquário do terceiro dia de depuração foi analisada, fechando o ciclo total de depuração (n=93h).

Após a depuração e previamente à contaminação artificial da água do aquário (Fluxograma 4), os animais foram colocados em um aquário limpo e descontaminado, já contendo 5L de água do mar filtrada. A seguir, uma solução líquida contendo zooplâncton e fitoplâncton própria para invertebrados marinhos filtradores foi adicionada ao aquário. O alimento foi previamente analisado por

reação de imunofluorescência direta (RID) com a finalidade de verificar a presença ou ausência dos protozoários patogênicos no mesmo.

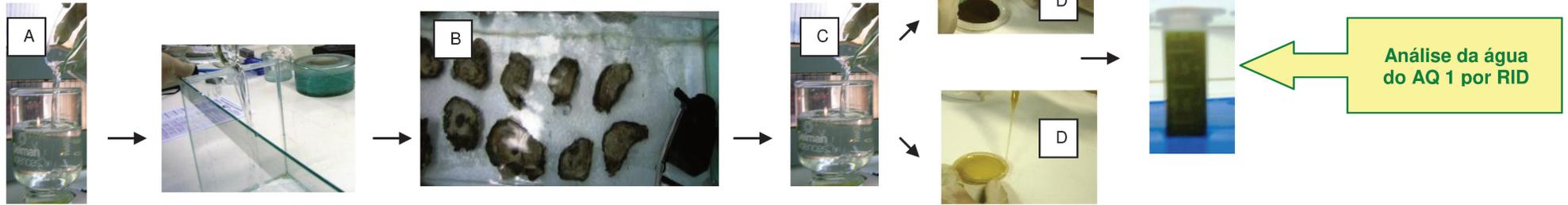
Em seguida à alimentação dos bivalves, um número conhecido de cistos e oocistos dos protozoários foi adicionado ao aquário, sendo a bomba aeradora mantida desligada durante este procedimento de contaminação artificial da água do aquário.

Decorridas 24h de exposição, os animais foram removidos do aquário, abertos e processados da mesma maneira que os exemplares analisados *in natura* para análise de seus tecidos (item 4.3.1).

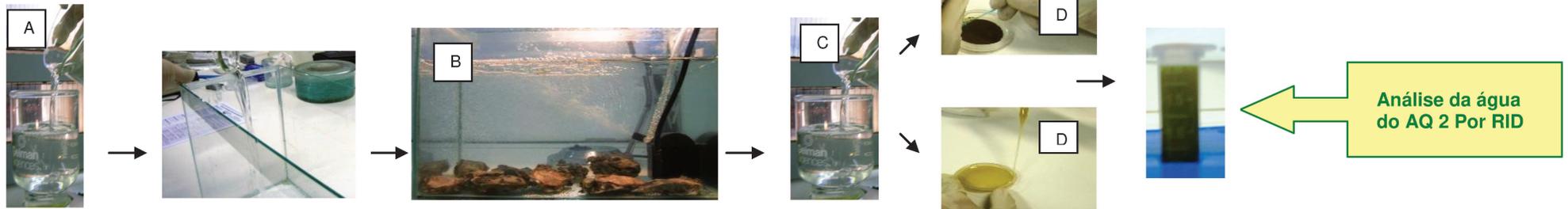
A água marinha contaminada foi filtrada, após homogeneização, e uma alíquota do material foi analisada por imunofluorescência direta, para enumerar o número de oocistos e cistos que eventualmente poderiam estar presentes no aquário, ou seja, o número de cistos e oocistos que não foram filtrados pelos animais.

### FLUXOGRAMA 3

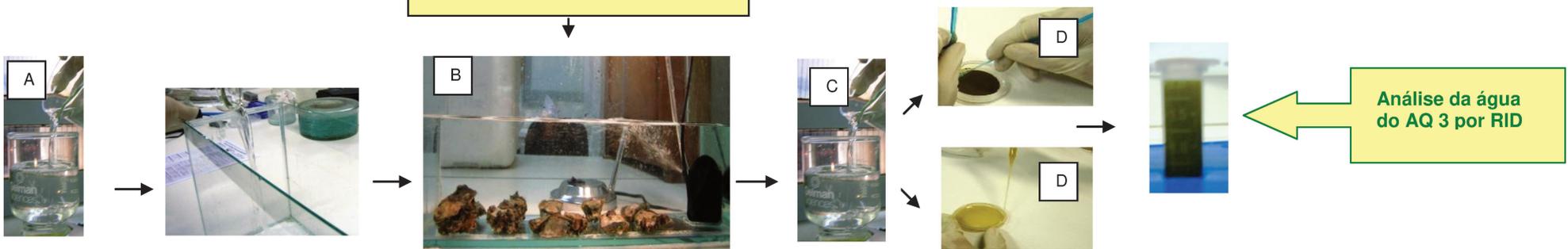
#### AQ 1. 41 horas de depuração



#### AQ 2. 26 horas de depuração



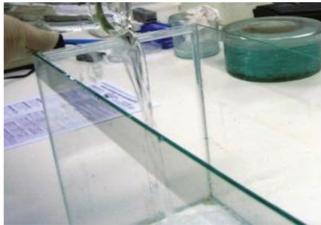
#### AQ 3. 26 horas de depuração



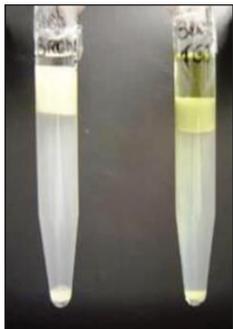
**Procedimento de depuração dos bivalves em diferentes aquários marinhos. A.** Pré-filtração de 5L de água marinha (para cada aquário) antes de: **B.** Acondicionamento dos animais nos aquários. **C.** Remoção e nova filtração da água de acondicionamento dos animais nos aquários, visando a pesquisa de eventuais protozoários liberados dos tecidos dos moluscos na mesma. **D.** Etapas de eluição das membranas.

## FLUXOGRAMA 4

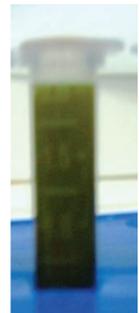
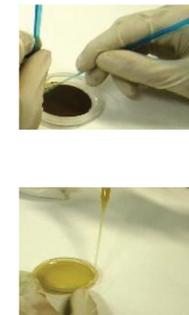
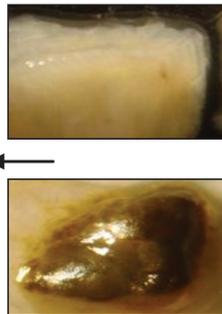
Contaminação artificial com oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*  
(Tempo de exposição = 24 horas)



Após 24 horas de contaminação artificial



Macerado e Centrifugação



Visualização dos protozoários nos tecidos dos moluscos e dos parasitos remanescentes no aquário pós-contaminação artificial

**Procedimento de contaminação artificial em aquário marinho após a etapa de depuração.** A. Pré-filtração de 5L de água marinha antes de: B. Acondicionamento dos animais no aquário. C. Alimentação dos bivalves com solução líquida (zooplâncton e fitoplâncton). D. Inoculação de um número conhecido de protozoários na água do aquário após a alimentação dos animais. E. Remoção dos animais do aquário e processamento conforme o fluxograma 1. F. Filtração da água do aquário e processamento conforme fluxograma 2.

#### 4.6.3.2.1 Cálculo da sensibilidade da metodologia aplicada no ensaio controle dos bivalves

O número de oocistos e cistos que permaneceram no aquário ao final do experimento controle foi calculado com a seguinte fórmula:

$$P = \frac{M \times N}{O} \quad (d)$$

Onde:

P = Número de oocistos e cistos remanescentes na água do aquário ao final do experimento controle

M = Número de oocistos ou cistos visualizados no poço da lâmina

N = Volume total do sedimento obtido da água do aquário ( $\mu\text{L}$ )

O = Volume do sedimento examinado no poço da lâmina ( $10\mu\text{L}$ )

Sabendo-se o número de cistos e oocistos que permaneceram no aquário, foi estimado o valor esperado de formas parasitárias que poderiam ser filtrados por animal, como segue:

$$E = \frac{Q - P}{T} \quad (e)$$

Onde:

E = Estimativa do valor esperado de oocistos ou cistos por animal presente no aquário

Q = Número inicial de oocistos e cistos usados na contaminação da água do aquário

P = Número de oocistos e cistos remanescentes na água do aquário ao final do experimento controle

T = 10 (Número de animais presentes no aquário)

O número de oocistos e cistos presentes no “pool” tecidual dos moluscos foi estimado, inicialmente, a partir da somatória do número de oocistos e cistos encontrados, respectivamente, nos macerados teciduais de brânquias e trato gastrointestinal na alíquota examinada (10 $\mu$ L) de acordo com a seguinte fórmula:

$$W = L + M$$

**(f)**

Onde:

W = Somatória do número total de oocistos ou cistos visualizados nos tecidos analisados em 10 $\mu$ L

L = Número de formas parasitárias visualizadas no “pool” tecidual de brânquias de 10 ostras

M = Número de formas parasitárias visualizadas no “pool” tecidual de trato gastrointestinal de 10 ostras

A estimativa final do número de formas parasitárias presentes no volume total de cada “pool” tecidual analisado foi verificada com a seguinte fórmula

$$A = \frac{W \times Z}{X}$$

**(g)**

Onde:

A = Número de oocistos e cistos presentes em ambos os “pool” teciduais de 10 animais

W = Somatória do número total de oocistos ou cistos visualizados nos tecidos analisados em 10µL

Z = Somatória do volume final do sedimento dos “pool” de brânquias e trato gastrointestinal

X = Volume do sedimento examinado no poço da lâmina (10µL)

O número de cistos e oocistos efetivamente filtrados (recuperados) por animal foi calculado com a seguinte fórmula:

$$R = \frac{A}{T}$$

**(h)**

Onde:

R = número de cistos e oocistos recuperados por animal

A = Número de cistos e oocistos presentes em ambos os “pool” teciduais de 10 animais

T = 10 (Número de animais presentes no aquário)

A sensibilidade da metodologia aplicada no ensaio controle dos bivalves foi calculada obedecendo à seguinte fórmula:

$$Y = \frac{R}{E} \quad (i)$$

Onde:

Y = Sensibilidade da metodologia em experimento de contaminação artificial da água do aquário (eficiência de recuperação) (%)

R = Número de oocistos e cistos recuperados por animal

E = Estimativa do valor esperado de oocistos ou cistos por cada animal presente no aquário.

#### **4.7 Visualização dos parasitos**

As diversas amostras de água e de animais foram analisadas por imunofluorescência direta. Para tanto, as amostras foram agitadas em vórtex Phoenix<sup>®</sup> AP- 56 por 2 minutos e, a seguir, invertidas 3 vezes com o propósito de tornar a distribuição de cistos e oocistos homogênea no tubo de microcentrífuga.

Após a homogeneização, 10µL de cada amostra foram cuidadosamente espalhados nos poços das lâminas de imunofluorescência. Após secagem por 30 minutos em temperatura ambiente, o material foi fixado com a adição de 10µL de metanol, para a realização de RID empregando o kit Merifluor<sup>®</sup> (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio).

Após 10 minutos, foi acrescentada uma gota do reagente de detecção contendo os anticorpos monoclonais e uma gota do contra corante, sendo as

preparações mantidas em câmara úmida e protegidas da luz durante 30 minutos em placas de Petri.

A seguir, foi realizada uma lavagem utilizando-se a solução tampão fosfato (pH 7,5) presente no kit Merifluor<sup>®</sup>, previamente diluída (1: 20) para retirar o excesso de anticorpo.

Em seqüência, 20µL do corante vital DAPI foi aplicado na diluição (1: 2500) nos poços das lâminas, sendo estas mantidas ao abrigo da luz durante 10 minutos. Após este período, foram realizadas 3 lavagens (1 minuto cada) com uma gota de solução tampão fosfato, seguida de uma lavagem com água Milli Q (uma gota/1 minuto).

As lâminas foram colocadas em dessecador contendo sílica, e foram mantidas protegidas da luz por uma hora. Finalmente, cada lâmina recebeu o meio de montagem e lamínula.

A visualização dos protozoários foi feita em microscópio de epifluorescência (Nikon<sup>®</sup> 50i), contendo filtro de excitação com comprimento de onda de 450 a 490nm e filtro de barreira de 520nm para a visualização da fluorescência e, filtro de excitação de 365 a 400nm e filtro de barreira de 395nm para a visualização da incorporação do DAPI e simultaneamente por microscopia de contraste de fase.

Os critérios de positividade para oocistos foram: o tamanho (3 - 8,5µm) e o formato (ovóides a esféricos), a presença de sutura e, o grau e intensidade de fluorescência verde-maçã brilhante predominante na parede dos oocistos de maneira uniforme, formando um anel típico.

Para os cistos, os critérios de positividade foram o tamanho (8 - 12µm) e o formato (ovóide), a presença de axonemas e, o grau e intensidade de

fluorescência verde–maçã brilhante predominante na parede dos cistos, de maneira uniforme, formando um anel típico.

Além dos critérios de fluorescência e morfometria, utilizou-se a microscopia de contraste de fase, observando-se a presença de esporozoítos, de corpo residual e aspecto da parede dos oocistos. Para cistos de *Giardia*, levou-se em consideração a número de núcleos (2 a 4), a disposição destes dentro do protozoário, a presença de axonemas e de corpos medianos.

No teste confirmatório da morfologia mediante a impregnação do corante vital DAPI, considerou-se a tonalidade azul-céu a esbranquiçada, visualização de núcleos (1 a 4), também azulados, dentro de um único protozoário.

#### **4.8 Análise estatística**

As amostras de água do rio, mar e dos moluscos bivalves foram avaliadas para verificar a contaminação natural pelos protozoários patogênicos *Cryptosporidium* e *Giardia*, inicialmente por meio de estatística descritiva.

Para a verificação da eventual associação entre os fatores físico-químicos, climáticos e microbiológicos e a ocorrência dos protozoários na água do rio e do mar, utilizou-se o teste de correlação de Pearson, com nível de significância de 5%. Para o estudo de correlação entre a qualidade das águas e a eventual contaminação dos moluscos bivalves utilizou-se o teste exato de Fisher, também com nível de significância de 5 %.

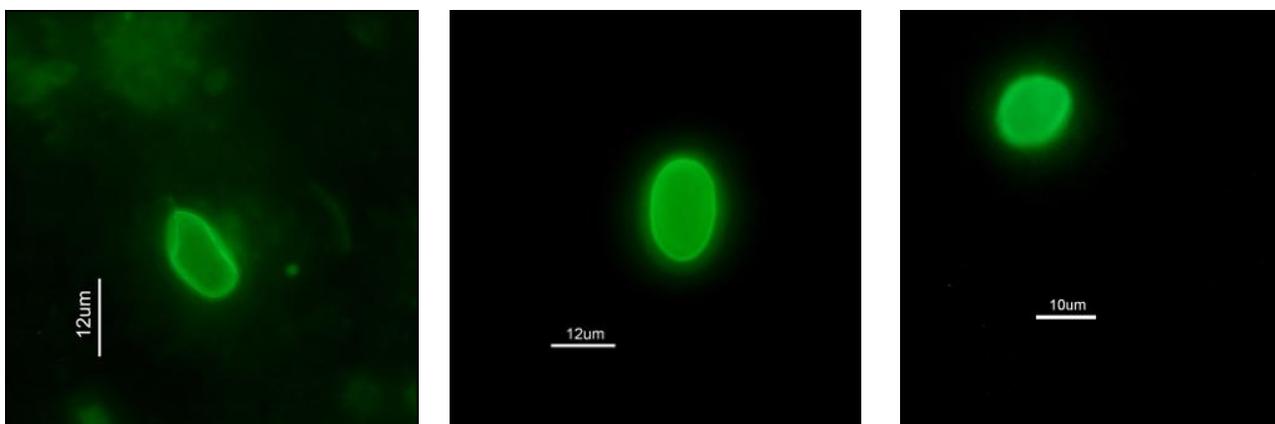
## 5. Resultados

### 5.1 Ocorrência natural dos protozoários patogênicos na água do Rio Ipiranga

Durante o período de um ano, foram coletadas 12 amostras de água do rio, sendo observado uma predominância de cistos de *Giardia* (Figuras 10, 11 e 12), sobre os oocistos de *Cryptosporidium* (Tabela 5).

Deste total de amostras, 66,6% continham cistos de *Giardia* (n = 8 amostras). O número de cistos do protozoário encontrado por litro variou de 30,7 a 184,6 (tabela 5). Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em 8,3% do total amostrado (n = 1 amostra).

A verificação da correlação entre os fatores físico-químicos, climáticos e indicadores bacteriológicos na água do rio e os protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* não foi significativa para nenhum fator analisado ( $p > 0,05$ ) (anexo 3).



Figuras 10, 11 e 12: Cistos de *Giardia* visualizados por RID nas amostras de água do rio Ipiranga.

**Tabela 5. Ocorrência natural de cistos e oocistos/L e fatores abióticos (físico-químicos e climáticos), em um ano de amostragem na água do rio Ipiranga com periodicidade mensal.**

<b>Coleta / Data</b>	<b>Oocistos / L</b>	<b>Cistos / L</b>	<b>Volume Filtrado</b>	<b>Volume Sedimento</b>	<b>pH</b>	<b>Salinidade (%)</b>	<b>T °C</b>
<b>I 12/07/06</b>	<b>ND*</b>	<b>50,0</b>	<b>4,0L</b>	<b>1ml</b>	<b>7.01</b>	<b>0,34</b>	<b>24.7</b>
<b>II 05/08/06</b>	<b>ND</b>	<b>30,7</b>	<b>6,5L</b>	<b>1ml</b>	<b>7.82</b>	<b>1,43</b>	<b>23.9</b>
<b>III 12/09/06</b>	<b>ND</b>	<b>45,4</b>	<b>2,2L</b>	<b>1ml</b>	<b>7.48</b>	<b>0,22</b>	<b>26.8</b>
<b>IV 15/10/06</b>	<b>ND</b>	<b>65,0</b>	<b>2,0L</b>	<b>1.3ml</b>	<b>7.60</b>	<b>0,05</b>	<b>24.7</b>
<b>V 14/11/06</b>	<b>ND</b>	<b>80,0</b>	<b>1,0L</b>	<b>0.8ml</b>	<b>7.05</b>	<b>0</b>	<b>22.2</b>
<b>VI 14/12/06</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>1,5L</b>	<b>0.8ml</b>	<b>7.0</b>	<b>0</b>	<b>25</b>
<b>VII 11/01/07</b>	<b>ND</b>	<b>184,6</b>	<b>1,3L</b>	<b>1.2ml</b>	<b>7.83</b>	<b>0,25</b>	<b>29.5</b>
<b>VIII 13/02/07</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>2,3L</b>	<b>1.1ml</b>	<b>7.28</b>	<b>0,1</b>	<b>28.9</b>
<b>IX 18/03/07</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>4,7L</b>	<b>2.0ml</b>	<b>8.72</b>	<b>0,32</b>	<b>29.2</b>
<b>X 18/04/07</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>2,0L</b>	<b>1.3ml</b>	<b>7.83</b>	<b>0,22</b>	<b>32.3</b>
<b>XI 16/05/07</b>	<b>ND</b>	<b>133,3</b>	<b>1,5L</b>	<b>1.0ml</b>	<b>6.80</b>	<b>0,04</b>	<b>26,6</b>
<b>XII 20/06/07</b>	<b>76,9</b>	<b>153,8</b>	<b>1,3L</b>	<b>1.0ml</b>	<b>7.62</b>	<b>0,02</b>	<b>25,2</b>
<b>Média</b>	<b>6,4</b>	<b>61,9</b>	<b>2,5L</b>	<b>1.1ml</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>26.5</b>
<b>Mediana</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>7,54</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>-</b>	<b>64,4</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>2.88</b>

ND = Não detectado; para efeito de cálculo de prevalência anual, foram considerados = zero

V = Maré vazante (baixa)

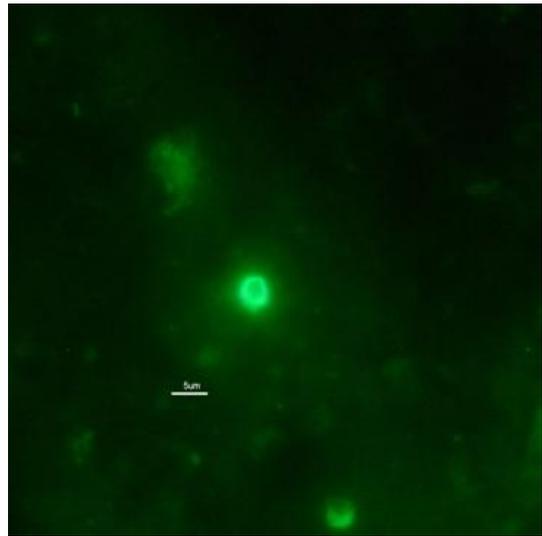
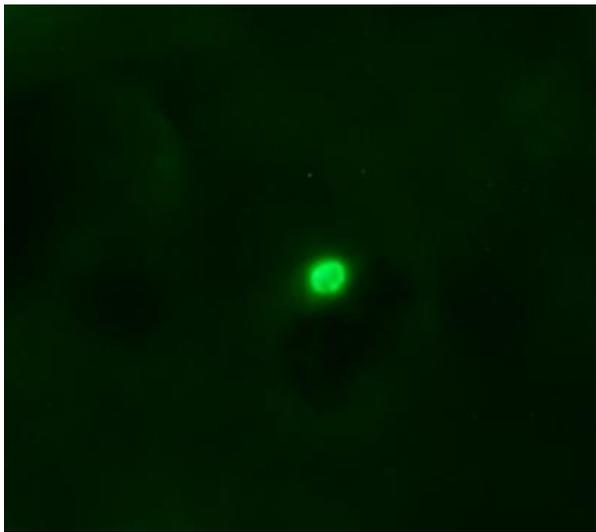
E = Maré de enchente (alta)

## 5.2 Ocorrência natural dos protozoários patogênicos na água do mar

As análises da água marinha referente ao período de 10 meses de amostragem revelaram positividade para ambos os protozoários em situação natural de contaminação (Tabela 6).

Os oocistos de *Cryptosporidium* (Figuras 13 e 14), foram detectados em 4 amostras (40,0%) e cistos de *Giardia* (Figura 15), em 2 amostras (20,0%).

A análise estatística da associação da contaminação por cistos e oocistos no ambiente marinho e os fatores físico-químicos e climáticos não revelou correlação significativa com o número de protozoários na água do mar ( $p > 0,05$ ) (anexo 4). Entre os indicadores microbiológicos, não houve correlação entre o número de oocistos detectados na água do mar e nenhum indicador analisado ( $p > 0,05$ ). Já para o número de cistos detectados no ambiente marinho, a análise revelou uma forte correlação com coliformes termotolerantes ( $p= 0,007$ ) (anexo 4).



Figuras 13 e 14: Oocistos de *Cryptosporidium* spp. detectados em amostras de água do mar.

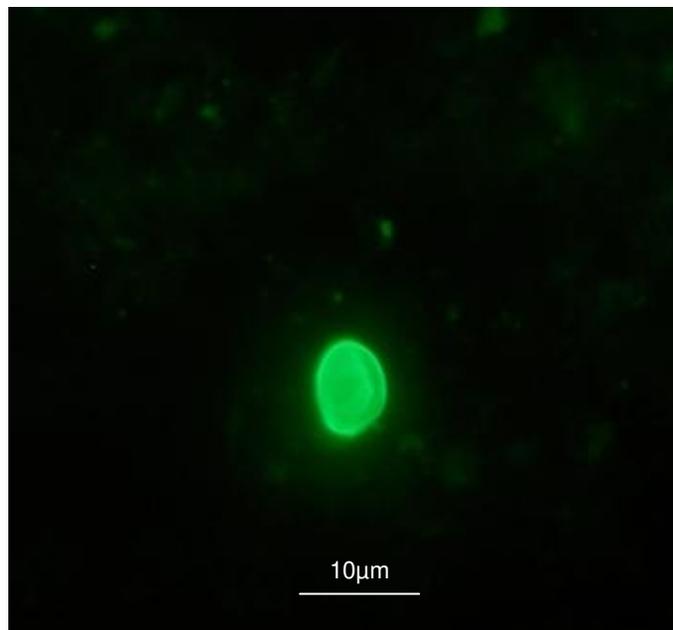


Figura 15: Cisto de *Giardia* encontrado na água do mar da praia do Camaroeiro.

**Tabela 6: Ocorrência natural de cistos e oocistos/L e fatores abióticos (físico-químicos e climáticos), durante o período de dez meses de amostragem da água marinha da praia do Camaroeiro com periodicidade mensal.**

<b>Coleta / Data</b>	<b>Oocistos / L</b>	<b>Cistos / L</b>	<b>Volume Filtrado</b>	<b>Volume Sedimento</b>	<b>pH</b>	<b>Salinidade (%)</b>	<b>T °C</b>
<b>I 12/07/06</b>	NR <sup>a</sup>	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>II 05/08/06</b>	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>III 12/09/06</b>	ND	ND	6,5L	1.0ml	8.57	1.5	27.8
<b>IV 15/10/06</b>	<b>ND</b>	<b>50,0</b>	<b>2,0L</b>	<b>1.0ml</b>	<b>8.80</b>	<b>1.26</b>	<b>25.4</b>
<b>V 14/11/06</b>	<b>72,0</b>	<b>ND</b>	<b>2,5L</b>	<b>1.8ml</b>	<b>8.45</b>	<b>1.05</b>	<b>22.8</b>
<b>VI 14/12/06</b>	<b>106,6</b>	<b>ND</b>	<b>3,0L</b>	<b>1.6ml</b>	<b>8.0</b>	<b>0,25</b>	<b>25</b>
<b>VII 11/01/07</b>	<b>45,0</b>	<b>ND</b>	<b>2,0L</b>	<b>0.9ml</b>	<b>8.26</b>	<b>0,15</b>	<b>29.0</b>
<b>VIII 13/02/07</b>	<b>ND</b>	<b>95,0</b>	<b>2,0L</b>	<b>1.9ml</b>	<b>7.64</b>	<b>0,22</b>	<b>29.8</b>
<b>IX 18/03/07</b>	ND	ND	3,0L	1.4ml	8.68	0,33	28.9
<b>X 18/04/07</b>	ND	ND	4,0L	4.0ml	8.15	0,32	30.8
<b>XI 16/05/07</b>	<b>180,0</b>	<b>ND</b>	<b>2,0L</b>	<b>1.8ml</b>	<b>8.11</b>	<b>0,32</b>	<b>27,3</b>
<b>XII 20/06/07</b>	ND	ND	5,0L	1.0ml	8.16	0,32	27,2
<b>Média</b>	40,3	14,5	3,2L	1.64ml	-	-	27.4
<b>Mediana</b>	-	-	-	-	8.21	-	-
<b>Desvio padrão</b>	62,0	32,3	-	-	-	-	2.43

NR<sup>a</sup> = Não realizado; início das coletas de água marinha no terceiro período

ND= Não detectado; para efeito de cálculo de prevalência anual, foram considerados = zero.

V = Maré vazante (baixa)

E = Maré de enchente (alta)

### **5.3 Ocorrência natural de protozoários patogênicos em moluscos bivalves**

O total de 120 ostras foram abertas e processadas para a análise de protozoários patogênicos. Durante o período de um ano de amostragem, ambos os protozoários patogênicos foram encontrados nos tecidos destes bivalves em uma ocasião cada, nos homogenados teciduais das brânquias (tabela 7). Assim, dos 12 “pool” teciduais analisados, oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* foram detectados em 8,3% das amostras.

A análise do número de protozoários bioacumulados por animal revelou no caso de *Cryptosporidium* 12 oocistos/animal no mês de Agosto de 2006 e, no mês de Abril de 2007, foram encontrados 50 cistos de *Giardia* por animal coletado.

Devido ao pequeno número de amostras positivas encontradas nos tecidos dos bivalves, não foi possível estabelecer correlação estatística entre a qualidade das águas e a contaminação dos moluscos pelos protozoários patogênicos *Cryptosporidium* e *Giardia*.

**Tabela 7: Ocorrência natural de oocistos e cistos nos “pool” teciduais de 10 ostras da praia do Camaroeiro, Litoral Norte do Estado de São Paulo, examinadas com periodicidade mensal.**

Coleta / Data	Volume do homogenado tecidual		<i>Cryptosporidium</i>		<i>Giardia</i>	
	TGI	Brânquia	TGI	Brânquia	TGI	Brânquia
I (12/07/06)	1000µL	1200µL	ND	ND	ND	ND
<b>II (05/08/06)</b>	<b>1000µL</b>	<b>1200µL</b>	<b>ND</b>	<b>120</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
III (12/09/06)	2000µL	1000µL	ND	ND	ND	ND
IV (15/10/06)	1500µL	1500µL	ND	ND	ND	ND
V (14/11/06)	2700µL	2650µL	ND	ND	ND	ND
VI (14/12/06)	1000µL	1600µL	ND	ND	ND	ND
VII (11/01/07)	3700µL	3900µL	ND	ND	ND	ND
VIII (13/02/07)	3800µL	2700µL	ND	ND	ND	ND
IX 18/03/07	4000µL	1700µL	ND	ND	ND	ND
<b>X (18/04/07)</b>	<b>12000µL</b>	<b>5000µL</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>500</b>
XI (16/05/07)	3600µL	4000µL	ND	ND	ND	ND
XII (20/06/07)	2000µL	2000µL	ND	ND	ND	ND

ND: Não detectado

#### 5.4 Análises microbiológicas da água do Rio e do Mar

A análise da contaminação por bactérias indicadoras nos ambientes aquáticos revelou altos índices de contaminação fecal (tabelas 8 e 9).

A análise microbiológica da água do rio apresentou concentrações elevadas e superiores às encontradas nas amostras de água do mar.

**Tabela 8: Análise bacteriológica de indicadores de contaminação fecal da água do rio Ipiranga em um ano de amostragem.**

Coleta	Data	Coliformes Termotolerantes (NMP)	Coliformes Totais	Estreptococos	Enterococos	<i>E. coli</i>
1	12/07/06	<b>4.0 x 10<sup>4</sup>*</b>	5.0 x 10 <sup>5</sup>	8.0 x 10 <sup>4</sup>	1.1 x 10 <sup>4</sup>	NR
2	05/08/06	7.0 x 10 <sup>2</sup>	2.4 x 10 <sup>4</sup>	2.2 x 10 <sup>3</sup>	7.0 x 10 <sup>2</sup>	NR
3	12/09/06	<b>3.0 x 10<sup>4</sup></b>	1.3 x 10 <sup>5</sup>	2.2 x 10 <sup>3</sup>	1.4 x 10 <sup>3</sup>	6.0 x 10 <sup>3</sup>
4	15/10/06	<b>2.2 x 10<sup>5</sup></b>	3.0 x 10 <sup>6</sup>	3.0 x 10 <sup>4</sup>	1.7 x 10 <sup>3</sup>	NR
5	14/11/06	<b>7.0 x 10<sup>4</sup></b>	1.1 x 10 <sup>6</sup>	9.0 x 10 <sup>4</sup>	1.4x 10 <sup>4</sup>	6.0 x 10 <sup>3</sup>
6	14/12/06	<b>1.1 x 10<sup>5</sup></b>	2.2 x 10 <sup>5</sup>	5.0 x 10 <sup>3</sup>	2.2x 10 <sup>3</sup>	2.2 x 10 <sup>4</sup>
7	11/01/07	<b>1.7 x 10<sup>4</sup></b>	1.7 x 10 <sup>4</sup>	2.4 x 10 <sup>3</sup>	1.3 x 10 <sup>3</sup>	1.4 x 10 <sup>4</sup>
8	13/02/07	<b>3.0 x 10<sup>5</sup></b>	9.0 x 10 <sup>5</sup>	5.0 x 10 <sup>3</sup>	5.0 x 10 <sup>2</sup>	NR
9	18/03/07	<b>8.0 x 10<sup>3</sup></b>	5.0 x 10 <sup>4</sup>	NR	NR	2.2 x 10 <sup>3</sup>
10	18/04/07	<b>8.0 x 10<sup>4</sup></b>	3.0 x 10 <sup>5</sup>	NR	NR	5.0 x 10 <sup>4</sup>
11	16/05/07	<b>1.1 x 10<sup>5</sup></b>	5.0 x 10 <sup>5</sup>	1.4 x 10 <sup>4</sup>	1.4 x 10 <sup>3</sup>	1.1 x 10 <sup>5</sup>
12	20/06/07	<b>8.0 x 10<sup>4</sup></b>	5.0 x 10 <sup>5</sup>	1.3 x 10 <sup>3</sup>	6.0 x 10 <sup>1</sup>	4.0 x 10 <sup>3</sup>

NR = Não realizado

\* = Indicadores bacteriológicos encontrados na água do rio com valores maiores que o permitido pela legislação CONAMA 357/05, que estabelece a quantidade máxima de bactérias nos diversos rios, córregos e canais que afluem às praias (1000 NMP/100ml).

**Tabela 9: Análise bacteriológica de indicadores de contaminação fecal da água marinha da praia do Camaroeiro em um ano de amostragem.**

Coleta	Data	Coliformes Termotolerantes	Coliformes Totais	Estreptococos	Enterococos	<i>E. coli</i>
1	12/07/06	NR	NR	NR	NR	NR
2	05/08/06	NR	NR	NR	NR	NR
3	12/09/06	<b>2.6 x 10<sup>3</sup>*</b>	9.0 x 10 <sup>3</sup>	8.0 x 10 <sup>2</sup>	2.0 x 10 <sup>2</sup>	4.0 x 10 <sup>2</sup>
4	15/10/06	<b>4.0 x 10<sup>3</sup></b>	1.3 x 10 <sup>5</sup>	5.0 x 10 <sup>3</sup>	<b>2.3 x 10<sup>3</sup></b>	NR
5	14/11/06	<b>1.3 x 10<sup>4</sup></b>	1.1 x 10 <sup>5</sup>	9.0 x 10 <sup>3</sup>	<b>4.0 x 10<sup>3</sup></b>	9.0 x 10 <sup>2</sup>
6	14/12/06	9.0 x 10 <sup>2</sup>	1.1 x 10 <sup>4</sup>	2.3 x 10 <sup>3</sup>	4.0 x 10 <sup>2</sup>	4.0 x 10 <sup>2</sup>
7	11/01/07	<b>6.0 x 10<sup>3</sup></b>	2.6 x 10 <sup>4</sup>	1.7 x 10 <sup>3</sup>	<b>1.4 x 10<sup>3</sup></b>	<b>4.0 x 10<sup>3</sup></b>
8	13/02/07	<b>3.0 x 10<sup>4</sup></b>	5.0 x 10 <sup>4</sup>	3.0 x 10 <sup>2</sup>	2.0 x 10 <sup>1</sup>	NR
9	18/03/07	4.0 x 10 <sup>2</sup>	8.0 x 10 <sup>3</sup>	NR	NR	4.0 x 10 <sup>2</sup>
10	18/04/07	<b>7.0 x 10<sup>3</sup></b>	1.7 x 10 <sup>4</sup>	NR	NR	<b>7.0 x 10<sup>3</sup></b>
11	16/05/07	8.0 x 10 <sup>2</sup>	2.3 x 10 <sup>3</sup>	4.0 x 10 <sup>1</sup>	4.0 x 10 <sup>1</sup>	8.0 x 10 <sup>2</sup>
12	20/06/07	7.0 x 10 <sup>2</sup>	1.7 x 10 <sup>3</sup>	2.3 x 10 <sup>2</sup>	8.0 x 10 <sup>1</sup>	2.0 x 10 <sup>2</sup>

NR = Não realizado

\* Indicadores bacteriológicos encontrados na água marinha com níveis maiores do que o permitido pela legislação CONAMA: 274/2000, que estabelece padrões de balneabilidade para uso recreacional.

## 5.5 Monitoramento da precipitação anual no município de Caraguatatuba

Os dados de precipitação pluviométrica foram obtidos a partir do sistema de monitoramento agrometeorológico (AGRITEMPO). A maior precipitação foi encontrada no mês de janeiro de 2007 (205,5mm) e a menor no mês de agosto de 2006 (3,5mm) (tabela 10).

**Tabela 10: Monitoramento da precipitação no município de Caraguatatuba no período de julho de 2006 a junho de 2007**

Coleta	Data	Precipitação (mm)
1	12/07/06	12,5
2	05/08/06	3,5
3	12/09/06	29,2
4	15/10/06	23,0
5	14/11/06	30,2
6	14/12/06	56,8
7	11/01/07	205,5
8	13/02/07	104,2
9	18/03/07	103,2
10	18/04/07	56,2
11	16/05/07	202,0
12	20/06/07	85,2

## 5.6 Experimentos de contaminação artificial para a água marinha

Os resultados obtidos nos experimentos controle positivos (Tabela 11) demonstraram a aplicabilidade da metodologia usada neste estudo a esse tipo de amostra. Nos experimentos controle-positivos (n = 3) a recuperação média para os oocistos de *Cryptosporidium* foi de 54,0 % e para os cistos de *Giardia*, 91,1 %.

**Tabela 11: Ensaio controle (n = 3) realizados para a verificação da sensibilidade da metodologia empregada para a detecção de protozoários patogênicos na água do mar**

Controle	Dose do inoculo		Eficiência de recuperação (%)	
	Oocistos	Cistos	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
I	1056	292	37,8%	102,7%
II	1200	290	50,0%	62,2%
III	1210	580	74,4%	108,6%
<b>Média</b>	-	-	<b>54,0%</b>	<b>91.1%</b>

## 5.7 Experimento de contaminação artificial dos bivalves

A sensibilidade da técnica empregada para a detecção de cistos e oocistos a partir dos “pool” teciduais dos moluscos bivalves, foi de 84,0 % para *Cryptosporidium* e 40,0 % para *Giardia*, como determinado no experimento controle empregando etapas de depuração em aquário. Durante o procedimento de depuração não foi observada taxa de mortalidade entre os animais. A análise das águas de depuração (acondicionamento) (n = 3) não acusou a presença de contaminação por oocistos e cistos dos protozoários patogênicos. A análise por RID do alimento fornecido aos bivalves também foi isenta das formas parasitárias.

## **6. Discussão**

### **6.1 Ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* na água do rio Ipiranga**

O despejo de esgoto doméstico sem tratamento ou tratado em corpos hídricos, principalmente em rios, é apontado na atualidade como a principal fonte de contaminação e deterioração destes ambientes e dos locais onde estes deságuam como as áreas costeiras e estuários (JOHNSON et al, 1995; FAYER et al, 2004a; LEAL et al, 2008 (anexo 5).

No Brasil, o despejo de esgoto *in natura* ainda é uma prática comum e no ano de 2000, somente 20,0 % dos municípios do país tratavam seu esgoto (IBGE, PNSB, 2000). Apesar de atualmente a taxa de coleta e tratamento do esgoto atingir quase 50,0 %, estes níveis são considerados baixos e insuficientes para a melhoria das condições sanitárias da população do país (FVG, 2007).

Esta prática implica na introdução de diversos microrganismos patogênicos, como as bactérias, vírus e protozoários nestes ambientes (WITTMAN e FLICK, 1995; FAYER et al, 2004a).

No caso deste estudo, os altos índices de bactérias indicadoras encontrados na água do rio (Tabela 8) atestaram a contaminação da água por fezes humanas e evidenciaram más condições da qualidade deste corpo hídrico, considerando os níveis de coliformes termotolerantes observados.

Em 11 meses, estes indicadores estavam em concentrações muito superiores ao valor máximo permitido pela legislação do CONAMA Nº. 357/05 (BRASIL, 2005), isto é, 1000NMP/100ml.

Embora este rio não seja utilizado para fins recreacionais pela população autóctone de Caraguatatuba, sabe-se que os rios, córregos e canais são os

principais responsáveis pela variação da qualidade das águas das praias, pois estão continuamente sujeitos a receberem elevadas cargas poluidoras, principalmente de origem doméstica (CETESB, 2006).

A legislação considera exclusivamente o grupo coliformes termotolerantes como indicadores das condições de corpos hídricos afluentes às praias. Visto que a CETESB não realiza o monitoramento do rio estudado e da praia do Camaroeiro, a pesquisa de outros quatro indicadores bacteriológicos foi introduzida neste estudo.

A investigação de outros indicadores bacteriológicos em ambientes aquáticos permite inferir com maior precisão a contaminação por fezes humanas ou de outros animais como os de sangue quente. Bactérias como *Escherichia coli* e *Streptococcus faecalis* também são habitantes comensais da flora intestinal de seres humanos e de animais homeotérmicos e sua presença nestes locais pode indicar que microrganismos patogênicos que ocorram nestas populações também podem estar presentes em ambientes aquáticos (PELCZAR JUNIOR et al, 1996).

Altas concentrações de outros grupos de bactérias indicadoras também foram verificadas: coliformes totais nos meses de outubro e novembro de 2006 (ordem de  $10^6$ ); *Escherichia coli* (ordem de  $10^5$ ) no mês de maio de 2007; estreptococos (ordem de  $10^4$ ) nos meses de julho, outubro e novembro de 2006 e maio de 2007.

A presença de bactérias do grupo coliformes (totais e termotolerantes) é amplamente empregada para indicar a presença de contaminação em ambientes aquáticos (ROMPRÉ et al, 2002), contudo, estes microrganismos não são considerados indicadores obrigatórios da presença de protozoários patogênicos

em águas superficiais (ROSE et al, 2002) sendo que a correlação entre a ocorrência dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* e o grupo coliforme ainda gera controvérsias. Mesmo quando os níveis de bactérias indicadoras estavam de acordo com os padrões exigidos pela legislação dos Estados Unidos, por exemplo, alguns surtos de veiculação hídrica tendo como agente etiológico o protozoário *Cryptosporidium* (incluindo o surto de Milwaukee) foram reportados (MACKENZIE et al, 1994; LISLE e ROSE, 1995).

Neste estudo, não foi encontrada correlação entre os cinco indicadores bacteriológicos pesquisados na água do rio e o número de cistos ou oocistos detectados (Anexo 3). Esta associação também não foi observada por outros pesquisadores (HO e TAM, 1998b; CARRARO et al, 2000).

Contudo, LeChevalier et al. (1991) encontraram uma correlação significativa entre a presença destes protozoários e a contaminação por bactérias fecais, bem como Atherholt. et al. (1998) e Hsu et al. (1999).

Deve-se ressaltar, que neste estudo, a despeito da ausência de correlação entre a presença dos indicadores bacteriológicos e a contaminação por cistos e oocistos na água do rio Ipiranga, estas formas parasitárias foram detectadas em concentrações significativas neste ambiente (Tabela 5).

No mês de Janeiro de 2007, foi detectada a maior concentração de cistos de *Giardia* (184,6/L – Tabela 5), considerando-se as 12 amostras analisadas. É importante salientar que neste mês, registrou-se o maior índice pluviométrico do período amostrado (205,5mm – Tabela 10).

De maneira similar, outros autores relataram o achado de oocistos de *Cryptosporidium* após altas precipitações pluviométricas (FERGUSON et al, 1996;

KISTEMANN et al, 2002). Existe uma intrínseca relação entre a ocorrência de eventos pluviométricos significativos e surtos de doenças de origem hídrica por indivíduos que utilizaram áreas destinadas à recreação humana, após estes eventos (ROSE et al, 2000).

Desta forma, é razoável apontar que o aumento da precipitação possa ocasionar, conseqüentemente, o aumento de infecções relacionadas por veiculação hídrica. Mais da metade de todos os surtos de veiculação hídrica que ocorreram nos Estados Unidos nos últimos 50 anos aconteceu logo após um aumento da precipitação pluviométrica e em decorrência de chuvas muito fortes (CURRIERO et al, 2001).

Apesar de neste estudo não ter sido constatada correlação significativa entre a precipitação pluviométrica e a ocorrência de cistos e oocistos na água do rio e também na água do mar, sabe-se que nos meses de verão ocorre uma maior quantidade de chuvas, que são responsáveis pelo súbito aumento da concentração de protozoários em ambientes aquáticos; nos períodos de estiagem, cistos e oocistos podem ficar aderidos às partículas presentes na água e acumularem-se nos leitos dos rios; após a ocorrência de chuvas, com o revolvimento do leito e do sedimento dos rios são encontradas maiores concentrações de protozoários em corpos hídricos (ATHERHOLT et al, 1998; ROSE et al, 2000; CURRIERO et al, 2001; DWIGHT et al, 2002).

Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em apenas uma amostra de água superficial de rio (junho de 2007) contudo, com uma concentração expressiva, cerca de 77 oocistos/L (Tabela 5).

De acordo com Smith et al. (2006a), os cistos de *Giardia* são mais abundantes que os oocistos de *Cryptosporidium* em águas superficiais e em águas destinadas ao consumo humano e existem mais surtos epidêmicos de giardiose por veiculação hídrica documentados do que por *Cryptosporidium*. Deve-se considerar que *Giardia* é nos dias de hoje o parasito intestinal mais comumente detectado no ser humano (THOMPSON, 2004).

Algumas características inerentes a ambos estes protozoários poderiam explicar esta discrepância: os cistos de *Giardia* são maiores que os oocistos de *Cryptosporidium* o que, de certa forma, facilita a sua visualização; oocistos de *Cryptosporidium* exibem maior capacidade de adesão às partículas em suspensão presentes em amostras líquidas (SEARCY et al, 2005) o que dificulta sua detecção. Neste estudo, em alguns meses verificou-se a adesão de oocistos de *Cryptosporidium* a partículas (Prancha 1- item A).

Devido à carga superficial negativa do oocisto, ocorre um aumento das forças eletrostáticas com determinadas partículas de carga diferentes (positivas) e isso promove uma maior adesão destes com diferentes partículas e sedimentos (SEARCY et al, 2005).

Além disso, tanto nas amostras de rio, como nas amostras de água do mar, observou-se em alguns meses uma grande quantidade de material em suspensão que conferiram às amostras um aspecto turvo dificultando a observação e classificação dos organismos devido à interferência ocasionada pela fluorescência residual observada nas preparações das lâminas de imunofluorescência (Prancha 1 – item B).

Ainda, a compactação de sujidades tornou a visualização destas formas parasitárias bastante difícil (Prancha 1 - item C) mesmo quando empregada a microscopia de contraste de fase como ferramenta confirmatória da morfologia dos protozoários. No entanto, em setembro de 2006, utilizando a mesma ferramenta supracitada, detectou-se com maior facilidade os cistos de *Giardia* (Prancha 1 - item D), onde observou-se uma menor concentração de partículas e sujidades na água do rio.

Ressalte-se que a porção estuarina do rio Ipiranga, está sujeita a uma ampla variabilidade de condições e também exposta a diferentes fatores bióticos e abióticos que podem alterar sua qualidade e composição ao longo do tempo (BROOKES et al, 2004), inclusive em decorrência da maré.

A cidade de Caraguatatuba possui na atualidade quase 89.000 mil habitantes (IBGE, 2007) e o fluxo de turistas na época de alta temporada aumenta cerca de 10 vezes (CARAGUATATUBA, 2007). Com isso, há concomitantemente um aumento do volume de efluentes produzidos e liberados, na maior parte, sem tratamento. Na cidade de Caraguatatuba, somente 32,0 % dos efluentes é coletado e tratado (SABESP, 2006), o que ainda representa uma fração maior de tratamento quando comparado à taxa total de tratamento de esgoto de todo o litoral norte, que corresponde a apenas 28,0 % (SABESP, 2006).

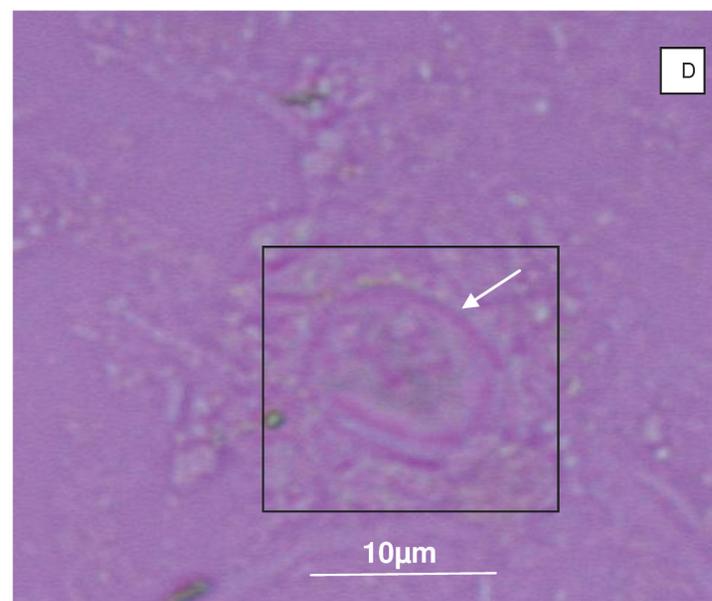
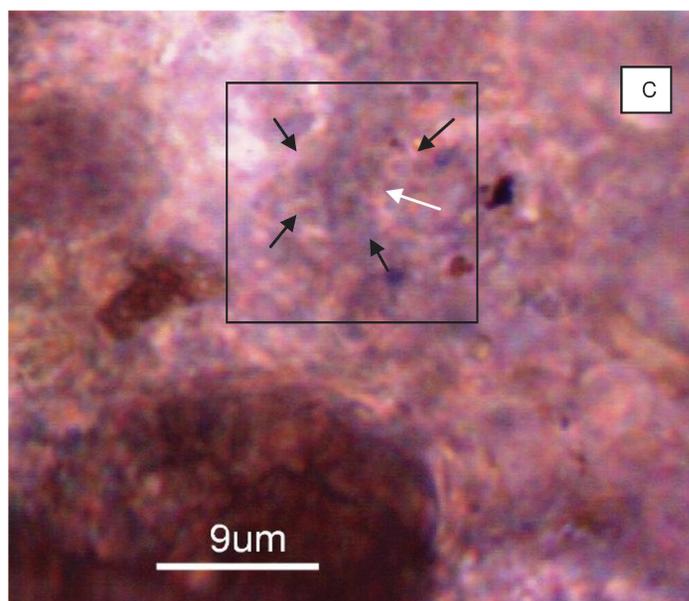
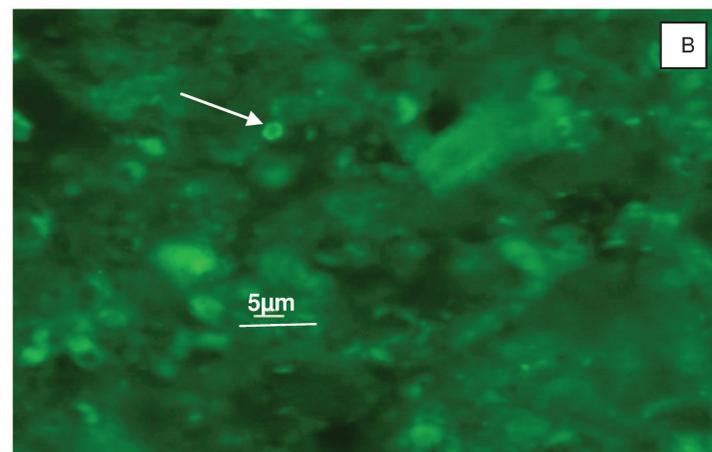
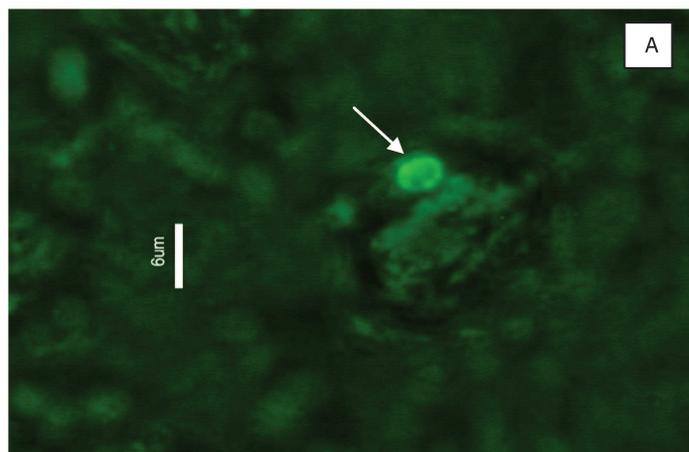
*Cryptosporidium* e *Giardia* também são freqüentemente encontrados em águas superficiais de rios ou em estações de tratamento de água quando ocorre um aumento dos níveis de turbidez na água ou quando ocorre a elevação do volume de água dos rios (ATHERHOLT et al, 1998; HAWKINS et al, 2000; CURRIERO et al, 2001). Além disso, existe uma extrema relação entre a remoção

de turbidez e conseqüentemente a remoção de patógenos de diferentes ambientes aquáticos como os mananciais e, por exemplo, em sistemas produtores de água (HAWKINS et al, 2000; HSU et al, 2000; BROOKES et al, 2004).

A degradação de mananciais, principalmente por efluentes domésticos tem aumentado no mundo todo, assim como a preocupação acerca da qualidade da água de diferentes ambientes aquáticos (GERBA e SMITH, 2005). Além disso, corpos hídricos como rios e córregos, podem impactar e introduzir protozoários encistados em áreas costeiras, contribuindo para a sua contaminação.

A estratégia ideal para acessar os fatores de risco relacionados com patógenos em ambientes aquáticos consiste na amostragem e monitoramento sistemático de organismos alvos. Esta amostragem deve ser aliada a um profundo conhecimento de fatores biológicos tanto destes ambientes quanto dos patógenos presentes nos locais monitorados, além da ampliação do estudo sobre os fatores químicos e físicos que estão envolvidos com seu transporte, distribuição e sobrevivência em ambientes aquáticos visando minimizar ou prevenir a presença ou entrada dos patógenos nestes locais (BROOKES et al, 2004).

**Prancha 1: Cistos e oocistos detectados através da RID e por microscopia de contraste de fase nas amostras analisadas (rio e mar) sob influência de partículas e fluorescência residual.**



**Legendas:** **A.** Oocisto de *Cryptosporidium* aderido à estrutura (40x); **B.** Oocisto diferenciado de organismos interferentes e fluorescência residual na lâmina de RID (20x); **C.** Compactação de material e obscurecimento da amostra de água do rio; cisto de *Giardia* (setas pretas) indicam a parede do cisto; seta branca: um par de corpos medianos característicos do protozoário; microscopia de contraste de fase (60x); **D.** Cisto de *Giardia* detectado na água do rio (setembro de 2006); microscopia de contraste de fase.

## **6.2 Ocorrência natural dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* na água marinha da praia do Camaroeiro.**

O mar é um dos mais importantes fornecedores de alimentos no mundo e é a principal fonte de proteínas para cerca de um bilhão de pessoas (MOLNAR, 2000). Na atualidade, alguns estudos têm apontado a aceleração da degradação de áreas costeiras devido aos impactos antrópicos (LIPP et al, 2001a, b; KAY et al, 2005; RIOU et al, 2007).

Naturalmente, devido ao grande aporte e extensão dos oceanos, estes ambientes conseguem suportar e depurar a enorme quantidade de resíduos e matéria orgânica que recebem. Porém, esta capacidade depuradora começa a demonstrar claros sinais de fragilidade, devido à aceleração do crescimento populacional, ocupação humana desordenada e a urbanização nas cercanias destes locais (PHILIPPI JUNIOR, 2005; MILLER JUNIOR et al, 2007).

A poluição de águas costeiras perto de áreas densamente povoadas é um grave problema; cerca de 45,0 % da população mundial vive no litoral ou em regiões próximas, e 14 das 15 maiores regiões metropolitanas (cada uma com 10.000.000 de pessoas ou mais) vivem perto destas áreas (MILLER JUNIOR, 2007).

A contaminação de ambientes marinhos por diversos microrganismos, entre eles os protozoários patogênicos, já foi reportada em alguns países do mundo, (Estados Unidos, Espanha, Austrália, Turquia, Holanda e Hong Kong) (ROBERTSON, 2007) estando esta contaminação associada, em alguns casos com o despejo direto de esgoto *in natura*.

Mesmo quando o esgoto é coletado e recebe tratamento antes de ser liberado em corpos hídricos, vale ressaltar que o tratamento de esgoto, quer seja ele aeróbio ou anaeróbio, não remove 100,0 % dos protozoários, sendo que a eficiência média do tratamento de esgoto após as etapas primárias e secundárias do tratamento é de 63,0 % a 90,0 % (LANE e LLOYD, 2002).

A pequena parcela de cistos e oocistos que não é removida após o tratamento, ainda pode continuar com sua capacidade infectante inalterada (OTTOSON et al, 2006; CANTUSIO-NETO et al, 2006), propiciando a introdução ou re-introdução destes protozoários patogênicos em ambientes aquáticos.

Deve-se salientar a importante contribuição da introdução de microrganismos patogênicos exercida por pequenos cursos de água que chegam até as praias, visto que usualmente recebem despejo de esgotos não tratados, inclusive de residências (DWIGHT et al, 2002; FAYER et al, 2004a).

Esta situação também foi verificada na praia do Camaroeiro, onde durante todo o período de amostragem da água do rio e do mar, verificou-se uma ausência de rede coletora de esgoto na região central da cidade, onde esta praia está localizada. Apenas a partir dos últimos meses de coleta das amostras, verificou-se, de acordo com a população local a implantação de rede de coleta de esgoto nesta região.

Dwight et al. (2002), verificaram que as praias de uma região costeira da Califórnia que apresentavam pequenos corpos hídricos ou pontos que recebiam o desaguamento de águas de rios, obtiveram os maiores níveis de bactérias indicadoras de contaminação fecal, tanto nos meses mais secos, como nos meses mais úmidos.

Um estudo conduzido na Baía de Santa Mônica, nos Estados Unidos, demonstrou que indivíduos que nadaram diretamente em frente a pontos que recebiam o escoamento urbano de água poluída após períodos de chuvas, contraíram muito mais enfermidades (50,0 %), do que indivíduos que nadaram mais afastados (cerca de 300 metros) deste ponto (HAILE et al, 1999)

Além da expressividade de rios e pequenos corpos hídricos como carreadores de patógenos para áreas costeiras, existe uma importante contribuição de fezes de animais domésticos que são descartadas e de animais silvestres que podem introduzir espécies zoonóticas dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* nestes locais (FAYER et al, 2004a; SUNDERLAND et al, 2007).

Fontes secundárias, porém não menos importantes estariam relacionadas com a drenagem hídrica de sedimentos, acidentes fecais (envolvendo principalmente crianças) que eliminam protozoários ao se banharem, rompimento de canos de esgoto e descarte de fezes em alto mar (FERGUSON et al, 1996; LIPP et al, 2001a; SUNDERLAND et al, 2007).

Estas práticas implicam em uma água geralmente de baixa qualidade e limita a utilização destas áreas para fins recreacionais ou para a produção e extração de produtos de origem aquícola (KAY et al, 2005; SUNDERLAND et al, 2007).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 30,0 % da população visitam as áreas costeiras todos os anos como fonte de lazer e para a prática de esportes (USEPA, 2006) e, aproximadamente 89 milhões de pessoas nadam em áreas recreacionais anualmente (WADE et al, 2006). Entretanto, entre os benefícios da

prática de esportes e de lazer que estas áreas proporcionam, existe um risco oculto para a saúde pública; contida nestas áreas podem estar presentes uma grande variedade de agentes patogênicos que podem causar efeitos adversos significativos à saúde humana (CRAUN et al, 2005).

Não há até o presente momento um programa nacional de monitoramento para os protozoários parasitas em águas costeiras e estuários freqüentados pela população dos Estados Unidos (FAYER et al, 2004 a).

Uma vez introduzidos em ambientes marinhos, os protozoários patogênicos (principalmente espécies de *Cryptosporidium*) sobrevivem por longos períodos, de alguns meses até mesmo um ano nestes locais constituindo um fator de risco para os banhistas e, sobretudo para indivíduos imunodeficientes ou imunossuprimidos (TAMBURRINI e POZIO, 1999; FAYER et al, 2004).

A ampla distribuição destes protozoários em ambientes marinhos reflete-se na contaminação de diversas espécies de mamíferos que habitam estes locais de acordo com vários estudos reportados na literatura. Cistos de *Giardia* spp. foram identificados em focas (*Phoca hispida*) de uma região ártica do oeste do Canadá (OLSON et al, 1997).

Os cistos do protozoário também foram detectados em fezes de focas (*Phoca groenlandica*; *Halichoerus grypus*; *Phoca vitulina*) que vivem na região leste do país, sendo que a caracterização molecular do protozoário revelou que todos os animais estavam infectados com *Giardia duodenalis* pertencente à assembléia A, subgrupo I, que é considerada zoonótica (MEASURES e OLSON, 1999).

Oocistos e cistos também foram identificados em leões marinhos (*Zalophus californianus*) da Califórnia (DENG et al, 2000), assim como também já foi identificado a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em peixe boi (*Dugong dugon*) na Austrália (HILL et al, 1997) e mais recentemente *Cryptosporidium hominis* nesta mesma espécie (MORGAN et al, 2000).

Na Espanha, na região da Galícia, ambos os protozoários já foram detectados em amostras fecais de lontras (*Lutra lutra*) (MÉNDEZ-HERMIDA et al, 2007a).

Todos estes estudos demonstram que diversas espécies de mamíferos marinhos estão infectadas com oocistos e cistos e, em algumas ocasiões, com espécies com potencial infectante para o ser humano. Além disso, estes animais podem constituir um reservatório destas infecções e contribuir para a manutenção da contaminação de áreas costeiras representando um risco a mais da aquisição destas protozooses para outros mamíferos marinhos, para os seres humanos que freqüentam estes locais e também para diversas espécies de moluscos bivalves filtradores que são destinados à alimentação humana.

Com o aumento da preocupação acerca da presença de protozoários patogênicos no ambiente marinho, percebe-se na atualidade o crescente interesse em detectar a presença destes patógenos em áreas costeiras (JOHNSON et al, 1995; FERGUSON et al, 1996; HO e TAM, 1998; LIPP et al, 2001a, b; CEBER et al, 2005; GÓMEZ-COUSO et al, 2005; SUNDERLAND et al, 2007).

Até o momento, para a detecção de protozoários em água do mar foram empregadas as metodologias de filtração em cartucho (JOHNSON et al, 1995; LIPP et al, 2001a, b; GÓMEZ-COUSO et al, 2005, 2006a; SCHETS et al, 2007),

floculação em carbonato de cálcio (FERGUSON et al, 1996; HO e TAM, 1998a) e apenas um estudo utilizou a técnica de filtração em membranas (SUNDERLAND et al, 2007) porém, com membranas maiores que as utilizadas neste estudo (293cm de diâmetro).

Johnson et al. (1995) utilizaram a técnica de filtração em cartuchos (porosidade nominal de 1µm) para filtrar grandes volumes de água (200L/amostra) para a pesquisa de cistos e oocistos em água do mar, em praias do Havaí. Estes autores salientaram que a grande dificuldade envolvida neste procedimento foi a baixa eficiência da sensibilidade da metodologia empregada para a sua detecção. Das três praias amostradas, durante 4 meses de coleta da água do mar, uma delas não apresentou contaminação por cistos e oocistos em nenhum mês de coleta e, as outras duas praias, apresentaram contaminação em apenas um mês (Janeiro), porém com concentrações muito baixas, 1 a 2 oocistos e cistos em 200L de água filtrada.

Entre os fatores que contribuíram para a baixa positividade detectada, pode-se citar o processamento das amostras que segundo estes autores é muito trabalhosa e envolve várias etapas laboratoriais o que pode acarretar na perda de cistos e oocistos durante o procedimento.

Um fato importante a ser ressaltado é que a maioria dos estudos descritos na literatura que relatam a presença de oocistos e cistos em água do mar não menciona a sensibilidade da técnica empregada para a detecção dos protozoários patogênicos neste tipo de amostra. A técnica de filtração em membranas utilizada neste estudo mostrou ter boa aplicabilidade para a detecção de protozoários na água do mar, pois a sensibilidade alcançada nos ensaios controle positivos

(Tabela 11) variou de 37,8 % a 74,4 % para os oocistos (média de 54,0 %) e de 62,2% a 108,6 % para os cistos (média de 91,1 %).

As eficiências de recuperação alcançadas neste estudo foram maiores que as encontradas por Ho e Tam (1998a), onde a sensibilidade da técnica de floculação alcançada para os cistos de *Giardia* foi de 40,0 %.

A obtenção de taxas de recuperação em ensaios controle positivos maiores que 100,0 % pode ocorrer devido à variabilidade inerente às técnicas de enumeração de cistos e oocistos que são empregadas na contaminação artificial das amostras. Esta é uma etapa trabalhosa e nesse estudo foi feita por mais de um observador para atestar com maior certeza o número de cistos e oocistos que foram utilizados nos experimentos de contaminação artificial da amostra.

Características como a idade e a origem das formas parasitárias, além do meio em que estas formas são armazenadas, podem influenciar os valores de recuperação, gerando variações entre o número de cistos e oocistos inoculados nas amostras controle e aqueles recuperados no final do experimento (BUKHARI et al. 1998; LINDQUIST et al., 1999).

Outro fator extremamente importante de variabilidade é a agregação dos cistos e oocistos o que pode interferir nos valores de recuperação dos protozoários. Sabe-se que os cistos de *Giardia* após serem purificados e armazenados em solução de formalina, agregam-se mais facilmente do que os oocistos de *Cryptosporidium* (YAKUB e STADTERMAN-KNAUER, 2000).

Nos ensaios controle realizados para verificar a sensibilidade da técnica de filtração em membranas quando aplicada à água do mar, empregou-se alíquotas

da mesma água que era examinada para a pesquisa da ocorrência natural destes protozoários.

Contudo, ao utilizar amostras ambientais para a realização destes ensaios, o investigador deve verificar se a amostra bruta que será utilizada para os experimentos de contaminação artificial, contém (ou não) cistos e oocistos ambientais o que poderia superestimar o valor de recuperação efetivamente obtido.

Embora atualmente exista um kit comercial disponível no mercado (ColorSeed<sup>®</sup>), onde os oocistos e cistos são marcados com um corante vital (sulforodamina) que fluorescem na cor vermelha, diferente da fluorescência exibida por cistos e oocistos ambientais, que fluorescem na cor verde maçã brilhante e possibilita a diferenciação dos protozoários inoculados daqueles naturalmente presentes na amostras ambientais, neste estudo não se utilizou este kit devido ao seu alto custo.

Assim, quando não é possível aplicar o ColorSeed<sup>®</sup> a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) recomenda que ambas as amostras (bruta e artificialmente contaminadas) sejam examinadas concomitantemente. Os valores de cistos e oocistos recuperados da água contaminada artificialmente devem ser subtraídos do número de protozoários encontrados na amostra bruta. Desta maneira, seguindo as recomendações desta agência regulatória (item 4.6.2), no caso deste estudo, confirmou-se que o número de cistos e oocistos recuperados do experimento controle para a água do mar foram aqueles inoculados na mesma, atestando a legitimidade deste experimento.

Entre os fatores que dificultam a análise de protozoários quando processando a água do mar é a presença de muitas algas que interferem no reconhecimento e classificação destes protozoários, fato este relatado também por Johnson et al. (1995). As algas contêm determinados pigmentos que fluorescem na mesma faixa que os oocistos e cistos (BIFULCO e SCHAEFER et al, 1993).

No caso deste estudo, um grande número de organismos e estruturas similares aos oocistos e cistos foi detectado nas amostras examinadas e em maior concentração na água do mar, devido à reação cruzada entre estes organismos interferentes e os protozoários. Nestas situações, a adoção de critérios de positividade estabelecidos anteriormente permitiram a correta diferenciação dos protozoários (Prancha 2).

Ademais, chama a atenção a grande quantidade de cistos e oocistos detectados em situação natural de contaminação da água do mar neste estudo, e também na água do rio, visto que esta última deságua diretamente no mar. Oocistos de *Cryptosporidium* estiveram presentes em 40,0 % das amostras examinadas, com concentrações variando de 45 a 180 oocistos/L e os cistos de *Giardia* em 20,0 % do total amostrado (50 a 95 cistos/L - Tabela 6).

Quando comparado à concentração destes protozoários patogênicos detectados em outros estudos em água do mar, a saber: 0,01 – 0,11 oocistos/L e 0,005 – 0,22 cistos/L (JOHNSON et al, 1995); 1 oocisto/L e 1 cisto/L (FERGUSON et al, 1996); 1- 23 cistos/L (HO e TAM, 1998); 10 – 16 oocistos/L e 16 cistos/L (LIPP et al, 2001a); 0,047 – 1,77 para ambos protozoários (LIPP et al, 2001b); 1- 17 oocistos/L e 0,4 – 29,3 cistos/L (GÓMEZ-COUSO et al, 2005; 2006a); 1- 4,9 oocistos/L e 0,6 cistos/L (SCHETS et al, 2007); 0 - 42 oocistos/L e 0 – 33 cistos/L

(SUNDERLAND et al, 2007), o presente estudo revelou a maior concentração de cistos e oocistos já reportada na literatura, até o momento.

Ressalte-se que, neste estudo, foram filtrados volumes muito menores que os utilizados pelos estudos apontados anteriormente (200L, 15L, 15L, 180L, 190L, 10L, 100 - 200L, 4L respectivamente).

Considerando que a presença de cistos e oocistos no ambiente está diretamente relacionada à infecção humana, é possível que a prevalência destas protozooses na cidade de Caraguatatuba seja elevada.

Ainda, espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* com potencial infectante para o ser humano podem estar presentes na praia do Camaroeiro, uma vez que a principal fonte de contaminação nesta praia é o esgoto de origem doméstica e, existe a possibilidade de espécies de origem zoonóticas estar presentes na água do mar.

Em estudos futuros, deve-se proceder etapas de isolamento dos protozoários do material amostrado e realizar ensaios de infectividade animal, considerado padrão ouro para este tipo de ensaio (ROBERTSON e GJERDE, 2007) e classificar genotipicamente as espécies dos protozoários com as ferramentas moleculares disponíveis na atualidade.

Quando considerado em conjunto os achados referentes à água do rio e do mar, é importante ressaltar que existe um efeito de diluição da água do rio quando esta adentra a água do mar. Além disso, a dispersão dos protozoários na água do mar é dificultada em função da concentração de salinidade; Bradford e Schijven (2002) verificaram que ocorria uma diminuição da dispersão dos protozoários conforme a concentração de salinidade aumentava.

Assim, em 8 meses foi detectada positividade para cistos de *Giardia* na água do rio e, em 2 meses, este protozoário foi encontrado na água do mar.

O efeito de diluição também foi observado na concentração de bactérias indicadoras na água do mar quando comparado à água do rio (Tabelas 8 e 9).

Apesar da diminuição da concentração destas bactérias na água do mar ter sido observada, os níveis encontrados foram considerados altos, onde algumas amostras apresentaram valores na ordem de  $10^4$  e  $10^5$ .

No caso de *Cryptosporidium*, o protozoário foi detectado em uma amostra de água de rio e em 4 amostras de água do mar. No entanto, é fato que a água do mar continha menos material particulado em suspensão o que pode ter facilitado a visualização dos oocistos. Além disso, foram necessárias um número maior de membranas para filtrar a água do rio do que a água do mar na maioria dos meses de coleta.

Neste estudo não houve uma correlação significativa entre o número de oocistos encontrados e fatores físico-químicos, climáticos e microbiológicos analisados na água do mar. É importante salientar que a turbidez não foi analisada neste estudo, pois outros pesquisadores reportaram que a turbidez demonstrou pouca ou nenhuma relação significativa com outros indicadores ou patógenos (LIPP et al, 2001a)

Quando considerado o número de cistos de *Giardia*, verificou-se uma correlação significativa em relação aos coliformes termotolerantes ( $p = 0,007$ ) (anexo 3). A presença de *Giardia* é comum em áreas impactadas pelo despejo de esgoto (BROOKES et al, 2004).

Bactérias indicadoras do grupo enterococos foram inseridas neste estudo, principalmente para a análise de água do mar, visto que este é considerado um bom indicador da qualidade de águas salinas e estão presentes também na areia das praias que podem carrear patógenos para a água do mar (ALM et al, 2003; PIANETTI et al, 2004; SATO et al, 2005; OLIVEIRA e WATANABE PINHATA, 2008).

Do total de meses amostrados (n = 10) em seis períodos a praia do Camaroeiro foi considerada com condições de balneabilidade não ideais para a recreação humana (Tabela 9), segundo a legislação do CONAMA 274/2000 (BRASIL, 2000).

Apesar de a praia ter sido considerada própria nos meses de dezembro de 2006 e maio de 2007 foram detectadas as maiores concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* (106.6/L no mês de dezembro de 2006 e 180/L no mês de maio de 2007 - Tabela 6).

Este fato mais uma vez suscita questionamentos sobre a utilização de indicadores microbiológicos em áreas destinadas à recreação humana, quanto à sua capacidade de prever a contaminação por cistos e oocistos de protozoários patogênicos.

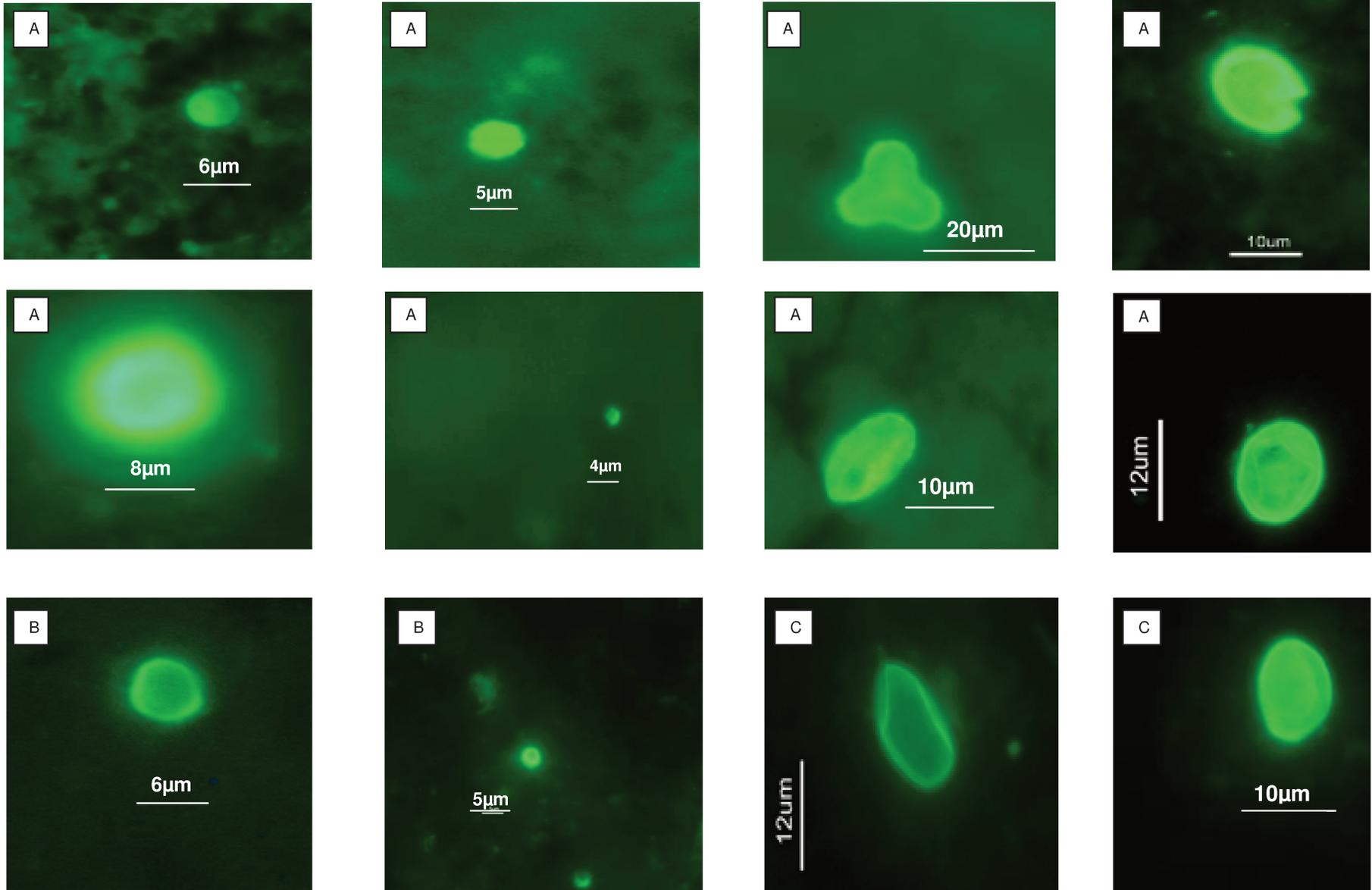
Sunderland et al. (2007) analisaram algumas praias dos Estados Unidos destinadas exclusivamente para fins recreacionais para a pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia*. As amostras foram coletadas durante os dias de semana e nos finais de semana, quando o número de banhistas era maior. Estes autores verificaram que nos finais de semana a concentração de oocistos e cistos foi muito superior àquela encontrada durante os dias de semana, verificando que a

presença destes protozoários estava diretamente relacionada com um maior contingente populacional que freqüentavam estas áreas.

No Brasil, não existe uma legislação específica que indique a pesquisa dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas destinadas à recreação humana e, diante do exposto, torna-se imperativo que esta pesquisa seja ampliada para as mais diversas áreas recreacionais do país, visto que estes protozoários podem estar presentes até mesmo em locais considerados com boas condições de balneabilidade.

Com as evidências do aquecimento global do planeta, onde as mudanças climáticas sinalizam para um aumento da precipitação, pode-se prever também um aumento do volume de rios que deságuam nas áreas costeiras e, conseqüentemente, deve ocorrer um aumento das doenças provocadas por patógenos de veiculação hídrica. (ROSE et al ,2000).

Prancha 2: Diferenciação de organismos encontrados nas amostras hídricas dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia*



**Legendas:** **A.** Formas encontradas no ambiente marinho e aquático durante o período de amostragem. **B.** Oocisto de *Cryptosporidium*. **C.** Cisto de *Giardia*; aumento de 20x, 40x e 60x.

### **6.3 Ocorrência dos protozoários parasitos em ostras destinadas ao consumo humano.**

As doenças transmitidas pelo consumo de alimentos contaminados representam um sério risco para a saúde pública e também acarretam importante repercussão econômica. Muitas destas doenças são causadas pelo consumo de moluscos bivalves que, por serem geralmente ingeridos crus ou levemente cozidos, propiciam a disseminação de numerosos agentes patogênicos para o ser humano.

Estes animais possuem uma excelente capacidade filtrante do ambiente que os margeiam e, desta forma podem remover e adsorver partículas e patógenos presentes nestes locais, ficando estes acumulados em seus tecidos (GÓMEZ-COUSO et al, 2003; LEAL e FRANCO, *no prelo* (anexo 2) LEAL et al, 2008) (anexo 5).

Diversos países já relataram a presença dos protozoários patogênicos *Cryptosporidium* e *Giardia* em diferentes espécies de moluscos bivalves destinados à alimentação humana (ROBERTSON, 2007) e, Leal et al. (2008) reportaram o achado de oocistos de *Cryptosporidium* pela primeira vez em vôngole (*Tivela mactroides*), muito consumido no Brasil e por alguns países da América do Sul. Os oocistos do protozoário estiveram presentes em 50,0% dos animais analisados, com concentrações de 60 oocistos/animal.

No presente estudo, realizado nos meses de julho de 2006 a junho de 2007, ambos os protozoários foram encontrados em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) destinadas ao consumo humano, pela primeira vez no Brasil e também na América Latina (LEAL et al, 2008).

Ressalte-se que neste município a catação dos moluscos é do tipo exploratória, não havendo fazendas de maricultura onde a criação dos animais é destinada ao consumo humano.

A presença de oocistos e cistos na água do mar da praia do Camaroeiro aliada à pequena taxa de sedimentação exibida por estes protozoários em águas superficiais (0,5µm/s) (ROSE et al, 1997), potencializa a remoção destas formas parasitárias pelas ostras e pelos demais moluscos bivalves presentes nesta região. Este fato também foi observado por GÓMEZ-COUSO et al. (2003) que verificaram que os moluscos bivalves bentônicos (ostras e mexilhões) que vivem fixos a substratos mais elevados como as rochas, apresentaram uma positividade maior para os oocistos de *Cryptosporidium* (38,2 %) comparativamente àqueles que são coletados e vivem nos sedimentos como algumas espécies de mariscos e vôngoles (26,9 %).

As ostras analisadas neste estudo vivem cimentadas em rochas e, alimentam-se quando a maré sobe, ficando estas submersas na água. Devido à maré, a água do mar mistura-se com a água do rio, havendo um aumento do número de patógenos e, em seguida, a diluição destes devido à movimentação das marés.

Considerando que a dose média infectante para os oocistos de *Cryptosporidium* é de 10 oocistos (COOPERATIVE RESEARCH CENTRE FOR WATER QUALITY AND TREATMENT, 2005) e que a ingestão de pelo menos 10 cistos de *Giardia* também é suficiente para iniciar uma infecção pelo protozoário em seres humanos (RENDTORFF, 1954), o número de protozoários encontrados

por animal (12 oocistos/animal e 50 cistos/animal) é suficiente para causar infecção em seres humanos.

A presença de apenas um oocisto do protozoário é capaz de iniciar a infecção em categorias populacionais mais vulneráveis (imunossuprimidos e imunodeficientes), representando um risco para a população (ROSE et al, 2002).

Deve-se ressaltar que os bivalves atuam naturalmente como bioindicadores dos ambientes em que vivem e, que estão expostos de maneira intermitente à contaminação por patógenos em função da variabilidade da qualidade da água.

Miller et al. (2005a) documentaram esta variabilidade ao monitorarem durante dois anos a contaminação de bivalves por *Cryptosporidium* e *Giardia* utilizando a Reação de imunofluorescência direta aliada a separação imunomagnética e também por PCR, na Califórnia. No primeiro ano de amostragem (2002), todos os animais foram negativos para os protozoários. Já no ano seguinte, ambos os protozoários foram detectados.

A variabilidade ano a ano não é surpreendente considerando a dinâmica de diferentes ecossistemas aquáticos, onde os bivalves são expostos à constante variação da qualidade da água, ao longo de um ano, como no caso do ambiente de estuário, examinado no presente estudo.

Apesar de alguns moluscos bivalves serem submetidos a procedimentos de cocção para a preparação de alguns pratos, como por exemplo, a utilização do vapor, estes, podem não ser suficientes para a inativação de protozoários patogênicos presentes em seus tecidos (GÓMEZ-COUSO et al, 2006c).

Ao analisar a cocção por vapor de tecidos mexilhões que haviam sido experimentalmente inoculados com oocistos de *Cryptosporidium*, Gómez-Couso et

al. (2006c) verificaram que estes mantiveram sua capacidade infectante inalterada, como comprovado por ensaio de infectividade animal, onde 50,0 % dos animais se infectaram com o protozoário.

Alguns procedimentos padrões de tratamento, empregados na preparação de alimentos por indústrias alimentícias (como o tratamento com microondas) já foram analisados visando verificar o potencial de inativação de oocistos de *Cryptosporidium parvum* experimentalmente presentes em tecidos de ostras através de bioensaios de infectividade animal (COLLINS et al, 2005).

No tratamento com microondas, os tecidos dos animais foram expostos a 1 segundo (temperatura de 42,2°C), 2 segundos (54,0 °C) e 3 segundos (62,5°C) e em todos os tempos de tratamento os camundongos se infectaram com os oocistos do protozoário. Também foi observado que nos tempos de 2 e 3 segundos, houve uma alteração da cor e da textura da carne dos moluscos o que inviabilizaria a sua comercialização.

Devido à manutenção de sua capacidade infectante nos tecidos dos bivalves e também da ineficiência dos métodos de cocção usualmente utilizados na preparação de moluscos, existe um risco da aquisição destas protozooses, principalmente quando estes são coletados de locais poluídos, como a praia do Camaroeiro.

A análise dos tecidos dos moluscos bivalves (brânquias e trato gastrointestinal) visando a detecção destes protozoários sob condições naturais de contaminação revelou positividade para os oocistos e cistos apenas nos tecidos branquiais, estando ausentes nos macerados de trato gastrointestinal (Tabela 7).

Neste estudo, houve uma maior dificuldade em relação à análise dos macerados de trato gastrointestinal que os homogenados branquiais. Devido às características do trato gastrointestinal das ostras, o homogenado produzido revela-se espesso, viscoso e contém uma grande quantidade de muco e lipídeos o que dificulta a fluidização deste tecido. Desta forma e devido à espessura do material na lâmina, oocistos e cistos podem ter sido mascarados e não ter sido detectados (LEAL et al, 2008).

Esta situação também foi reportada por Schets et al. (2007) que relataram uma grande dificuldade para analisar este homogenado tecidual. Graczyk et al. (1997a, b) demonstraram a internalização de oocistos de *Cryptosporidium parvum* por hemócitos de ostras nativas (*Crassostrea virginica*) e verificaram que conforme o tempo de contato entre os oocistos e os hemócitos aumentava, ocorria uma diminuição da fluorescência na parede do oocisto e, sugeriram que esta se desintegraria com o tempo. No caso deste estudo, os oocistos detectados apresentavam-se íntegros, sem alterações visíveis quando empregada a RID.

O maior encontro de oocistos nas brânquias pode ser explicado pelo fato que os poros branquiais e os oocistos apresentam o mesmo tamanho, o que facilitaria a retenção dos mesmos nas brânquias (GÓMEZ-COUSO et al, 2003).

Outro fator importante a ser considerado é o número de animais que compõe o “pool” tecidual, visto que quanto maior o número de animais que são utilizados para a formação de um “pool”, maior a concentração de material mucoso presente na amostra. Neste estudo, foi analisado um grande número de animais (10 animais/amostra) quando comparado aos demais estudos que também examinaram a presença destes protozoários em homogenados teciduais de

ostras: (*Ostrea edulis*; n = 7) (GÓMEZ-COUSO et al, 2003); (*Ostrea edulis*; n = 9); (GÓMEZ-COUSO et al, 2004); (*Crassostrea gigas*; n = 6) (SCHETS et al, 2007).

Os animais coletados durante todo o período de amostragem mediam de 3 a 6cm, tamanho este previamente estabelecido devido à praticidade de se trabalhar com pool teciduais menores e também por ter sido demonstrado não haver diferença significativa entre o tamanho das ostras e a remoção de patógenos (GRACZYK et al, 2007a).

Para o presente estudo, optou-se pela análise de “pool” de macerados teciduais das ostras em detrimento a análise individual de cada animal visto que a análise de “pool” teciduais pode diminuir custos, sem significante perda de sensibilidade (MILLER et al, 2005a). Quando comparada a sensibilidade do método de detecção de oocistos e cistos em pool teciduais e a partir de tecidos analisados individualmente em laboratório, Miller et al. (2005a) não encontraram diferença significativa nas eficiências de recuperações alcançadas.

A detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* através da reação de imunofluorescência direta (RID) têm sido empregada há mais de uma década em amostras fecais e hídricas e mais recentemente, aplicada para a análise de tecidos de bivalves (MILLER et al, 2006)

Os principais benefícios de se utilizar a reação de imunofluorescência direta são: a possibilidade de obter informações quantitativas dos protozoários em uma dada amostra; os oocistos e cistos podem ser identificados visualmente pelas características de fluorescência da parede, pelo tamanho e morfologia; a RID pode ser aplicada a amostras preservadas em formalina, diferentemente da técnica de PCR, onde é mandatório que a amostra não seja preservada com nenhum fixador

e que sejam mantidas em temperatura de congelamento até a sua utilização (GÓMEZ-COUSO et al, 2003; MILLER et al, 2006).

Porém, a RID apresenta algumas limitações: requer pessoal treinado e com experiência para correta classificação e distinção entre os protozoários e outros organismos interferentes e, não fornece informações sobre a espécie encontrada, a qual somente pode ser determinada com o emprego de técnicas moleculares.

Freire-Santos et al. (2000b) utilizaram diferentes colorações para identificação de oocistos de *Cryptosporidium* em macerados teciduais de diferentes espécies de moluscos bivalves; entre elas, a coloração negativa com verde de malaquita, Ziehl-Neelsen modificado, coloração com auramina-rodamina e imunofluorescência direta. Embora estes autores tenham relatado resultados equivalentes de detecção com a maioria das colorações utilizadas, nos dias de hoje é recomendável, e mais aceito por diversos pesquisadores que a reação de imunofluorescência seja amplamente utilizada para a detecção de protozoários em tecidos de bivalves.

Fayer et al. (1997) e Graczyk et al. (1998) demonstraram em seus experimentos que os melhores resultados são obtidos quando se emprega a RID ao invés de colorações álcool-ácido resistente. Como um dos propósitos deste estudo era determinar o número de formas parasitárias por animal, devido à implicação em saúde pública, optou-se pelo uso da RID pelo fato desta fornecer dados quantitativos para o levantamento epidemiológico proposto.

Fayer et al. (2003) ao compararem a RID e a PCR, não conseguiram estabelecer qual das duas técnicas de detecção seria superior à outra. Ao analisarem 17 pontos diferentes de coleta de moluscos da Costa Atlântica dos

Estados Unidos, estes autores encontraram positividade para *Cryptosporidium* em 10 pontos quando empregada a RID; contudo, estes 10 pontos foram negativos quando se utilizou o PCR. Ao contrário, 7 dos 14 pontos onde se encontrou positividade para os oocistos com PCR, quando se utilizou a RID, todos os pontos foram negativos para o protozoário.

Estas ambigüidades também foram relatadas por Gómez-Couso et al. (2006a) onde 38 das 42 amostras de tecidos de mexilhões identificadas como positivas para os oocistos do protozoário por RID, foram negativas quando se empregou a PCR sob condições naturais de contaminação. As possíveis falhas da amplificação de DNA pelo PCR foram atribuídas à presença de inibidores na amostra e, possivelmente, à falha da técnica de identificar oocistos que poderiam estar vazios.

Miller et al. (2005a) verificaram que a RID em combinação com a separação imunomagnética também foi superior ao PCR na detecção de cistos de *Giardia* em homogenados intestinais de mariscos.

Outro estudo de comparação entre os métodos de detecção de oocistos por RID e PCR, sob condições artificiais de contaminação, demonstrou que uma maior porcentagem de oocistos foram identificados quando se utilizou a RID e, os autores concluíram que esta técnica deve ser utilizada no lugar do PCR para estudos rotineiros da presença de protozoários em tecidos de bivalves (GÓMEZ-COUSO et al, 2006b).

Uma vez que os cistos de *Giardia* ocorrem mais frequentemente em águas superficiais que os oocistos de *Cryptosporidium*, poderia ser esperado que *Giardia* ocorresse mais frequentemente nos moluscos bivalves que *Cryptosporidium*. No

entanto, na maioria dos estudos em que a pesquisa de *Giardia* em tecidos de moluscos também foi inserida, o protozoário foi detectado em menores proporções de amostras que os oocistos de *Cryptosporidium* (ROBERTSON, 2007), com exceção de um estudo onde *Giardia* foi identificada em grande quantidade de amostras (GÓMEZ-COUSO et al, 2005a).

No presente estudo, ambos os protozoários foram encontrados nas ostras (Tabela 7). No entanto, Leal et al. (2008) no ano de 2005 não encontraram positividade para cistos de *Giardia* nos tecidos de vôngoles coletados na mesma praia onde foi realizado este estudo.

Graczyk et al. (2003) conduziram um experimento de contaminação artificial em aquário contendo mariscos, sendo que o triplo do número de cistos de *Giardia* foi inoculado no aquário em relação aos oocistos de *Cryptosporidium*. Os autores observaram que uma concentração muito maior de oocistos foi acumulada pelos animais, indicando que durante a filtração e remoção de protozoários patogênicos de ambientes aquáticos, pode ocorrer algum processo biológico ou uma maior afinidade por partículas de menor tamanho, como os oocistos do protozoário.

Resultados similares também foram obtidos em outro estudo de contaminação artificial, desta vez utilizando-se ostras (*Crassostrea ariakensis*), que removeram mais oocistos em relação aos cistos e, neste caso, as mesmas concentrações de ambos os protozoários haviam sido inoculados em aquário (GRACZYK et al, 2006).

Estes dados são concordantes com os resultados encontrados no presente estudo, onde sob condições artificiais de contaminação em aquário marinho, verificou-se uma maior remoção e acumulação de oocistos de *Cryptosporidium*

mediante a análise e enumeração por RID dos macerados teciduais e branquiais das ostras, após o período de exposição às formas parasitárias.

A sensibilidade da metodologia empregada para a detecção destes protozoários também foi maior para os oocistos (84,0 %) do que para os cistos (40,0 %), sensibilidades estas consideradas maiores que as reportadas por outros estudos. As eficiências de recuperação descritas na literatura são variáveis. Graczyk et al. (1999) reportaram uma eficiência de recuperação em torno de 50,0 % para oocistos de *Cryptosporidium* em tecidos de mexilhões utilizando a RID.

Gómez-Couso et al. (2006b) encontraram uma eficiência de recuperação de aproximadamente 70,0 % ao analisar por RID tecidos brânquias e trato gastrointestinal de mexilhões contaminados artificialmente com oocistos de *Cryptosporidium* e MacRae et al. (2005) reportaram diferentes eficiências de recuperação para *Cryptosporidium* em diferentes espécies de bivalves, variando de 12,0 % a 34,0 % para mexilhões e de 48,0 % a 69,5 % para vieiras.

Diferentemente de outros autores que utilizaram o tampão PBS para macerar os tecidos dos animais em homogeneizador de tecidos, neste estudo e nesta etapa, foi empregada solução de eluição contendo o surfactante Tween 80, que acarretou uma maior remoção de lipídeos dos tecidos dos animais e, conseqüentemente, promoveu a melhor visualização das formas parasitárias, como demonstrado no experimento de contaminação artificial dos bivalves (item 5.7).

Uma vez presentes nos tecidos dos moluscos, a menor recuperação de cistos a partir de macerados teciduais, é explicada pelo comportamento hidrofóbico exibido pelos cistos de *Giardia* (DAI et al, 2004); desta forma, a sua

recuperação na fase líquida, após macerar o tecido é mais difícil. Futuros estudos devem focar a adição de substâncias que anulem ou interfiram neste comportamento exibido pelos cistos a fim de que se obtenham melhores resultados.

Durante a condução do experimento de contaminação artificial dos moluscos bivalves, os animais foram submetidos previamente ao procedimento de depuração, visto que os mesmos foram coletados de seu ambiente natural e desta forma, poderiam conter cistos e oocistos ambientais em seus tecidos o que acarretaria em superestimação da sensibilidade da metodologia.

Com a finalidade de garantir que os animais estivessem livres de contaminação natural, os mesmos foram submetidos a esta etapa de depuração por (93h), tempo este muito superior ao que é utilizado nas fazendas de maricultura no Estado de São Paulo (cerca de 3 a 8 horas) (MELO, 2007; O ESTADO DE SÃO PAULO, CADERNO AGRÍCOLA).

Previamente à introdução dos animais nos diferentes aquários, foram filtrados volumes de 5L de água do mar e, desta forma, a água que seria adicionada a cada aquário para o acondicionamento dos animais, estaria livre da contaminação natural por oocistos e cistos.

Considerando-se que a análise da água de acondicionamento dos animais nos diferentes aquários não revelou contaminação por cistos e oocistos, pode-se inferir que os animais não continham oocistos e cistos ambientais e que as formas parasitárias posteriormente encontradas em seus tecidos foram aquelas artificialmente inoculadas no aquário.

Os animais também foram alimentados antes da inoculação dos protozoários na água do aquário com a finalidade de estimular a filtração das formas parasitárias pelas ostras sendo que durante as 24h em que os animais ficaram expostos aos protozoários, a água recebeu contínua agitação e oxigenação visando reproduzir as condições naturais existentes na praia.

A análise prévia do alimento fornecido aos bivalves também é importante visto que alguns estudos apontaram que, sob condições artificiais de contaminação, rotíferos e microcrustáceos como as artêmias (elementos do zooplâncton que servem de alimento para os bivalves), também removem oocistos de espécies de *Cryptosporidium*, sendo capazes de contribuir para a dispersão da contaminação destes protozoários nos ambientes aquáticos (FAYER et al, 2000b; MÉNDEZ-HERMIDA et al, 2007b).

Gómez-Couso et al. (2005b) verificaram em ensaio de contaminação artificial que mariscos mantidos em aquário e abertos após 24 horas de exposição a oocistos de *Cryptosporidium parvum* haviam removido e acumulado em seus tecidos 86,0% da dose de oocistos inoculados. Por esta razão, no presente estudo os animais foram sacrificados exatamente após 24h de exposição aos protozoários.

Ademais, neste estudo, o maior encontro dos protozoários em homogenados branquiais (no experimento controle positivo) reflete o curto período de exposição dos moluscos aos protozoários.

Freire-Santos et al. (2001) ao analisar os tecidos de vôngoles submetidos previamente à contaminação artificial com oocistos de *C. parvum*, encontraram uma maior concentração de oocistos nos tecidos branquiais e apontaram que em

tempo de exposição superior a 48h, o maior encontro dos protozoários se daria no trato gastrointestinal e na hemolinfa.

Fayer et al (1998) ao compararem o número de oocistos encontrados nas brânquias e nos hemócitos, relataram que após 3h de exposição, 15 de 20 ostras examinadas continham mais oocistos nas brânquias contra 4, que apresentaram maior concentração nos hemócitos.

Graczyk et al. (1998) demonstraram que a densidade de oocistos encontrados nas brânquias e no trato gastrointestinal foi maior com tempos de exposição de 24h e 48h ao passo que na hemolinfa, a concentração de protozoários foi inicialmente pequena nas primeiras 24h e este número aumentou progressivamente até o 7º dia de exposição dos animais.

É fato que na praia do Camaroeiro as ostras e vôngoles são coletadas em grandes quantidades pela população autóctone sem nenhuma fiscalização ou supervisão de organizações federais ou de agências ambientais regulatórias (LEAL et al, 2008).

Considerando que no Brasil a resolução do CONAMA Nº. 357/05 (BRASIL, 2005) apenas contempla a análise de coliformes fecais em águas onde os moluscos são cultivados, é necessária a inclusão do monitoramento destes protozoários nestes locais e também nas fazendas de maricultura, além de obviamente dos animais que serão destinados à alimentação humana.

Fatores que poderiam ser apontados para a extrema necessidade da inclusão da pesquisa destes protozoários pela legislação e pelo PNCMB seriam: a pequena dose infectante necessária para causar a infecção em seres humanos; a natureza oportunista de *Cryptosporidium*; a endemicidade de *Giardia* no Brasil e a

ineficiência do processo de depuração destes protozoários em tecidos de moluscos (GÓMEZ-COUSO et al, 2003).

De acordo com Rippey (1994) e Graczyk et al. (2007a) nos países desenvolvidos, a população portadora de deficiências imunológicas está mais conscientizada dos riscos da aquisição de doenças que podem ser severas e de caráter oportunista mediante a ingestão de moluscos bivalves consumidos crus ou levemente cozidos e desta forma, evitam com maior frequência a ingestão deste tipo de alimento.

No Brasil, as campanhas de elucidação da população sobre os riscos de ingestão de ostras e em geral de moluscos consumidos crus e mal-cozidos, precisam ser incentivadas e, sobretudo, direcionadas aos indivíduos menos favorecidos economicamente que utilizam este tipo de alimento para subsistência com frequência.

Tomados em conjunto a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* na água do rio, água do mar e nos moluscos bivalves, revelam a ampla distribuição da contaminação por estes protozoários na praia do Camaroeiro. Neste contexto, este trabalho representa uma importante contribuição para a saúde pública no país.

## 7. CONCLUSÕES

As conclusões deste estudo foram:

1. A presença de dois protozoários patogênicos de transmissão hídrica foi observada na água do rio Ipiranga, município de Caraguatatuba, sendo que cistos de *Giardia* foram detectados em maior número de amostras (66,6 %) e em maiores concentrações (30,7 a 184,6 organismos/L) comparativamente aos oocistos de *Cryptosporidium* (8,3 %; n=1) e concentração de 76,9 organismos/L.
2. A água do mar apresentou positividade para ambos os protozoários, sendo que *Cryptosporidium* esteve presente em maior número de amostras (40,0 %), com concentrações variando de 45 a 180 organismos/L do que os cistos de *Giardia* (20,0%), com concentrações de 50 a 95 organismos/L.
3. A técnica de filtração em membranas apresentou boa aplicabilidade para a análise de protozoários em água do mar considerando-se a sensibilidade média alcançada, em três ensaios-controle: 54,0 % para os oocistos de *Cryptosporidium* e 91,1% para os cistos de *Giardia*.
4. Não houve correlação estatística significativa entre o número de oocistos e cistos encontrados na água do rio Ipiranga e os fatores físico-químicos, climáticos e microbiológicos ( $p > 0,05$ ).

5. Também, para a água do mar, não foi verificada correlação significativa entre o número de oocistos/cistos e as variáveis supracitadas. Para os cistos de *Giardia*, foi observada uma forte correlação entre o número de cistos presentes na água do mar e os coliformes termotolerantes ( $p = 0,007$ ).
6. A praia do Camaroeiro foi considerada como não ideal para fins recreacionais em 60,0 % do período amostrado; no entanto, nos dois meses em que obteve condições ideais de balneabilidade, foram encontradas as maiores concentrações de oocistos de *Cryptosporidium*.
7. A contaminação de ostras da espécie nativa (*Crassostrea rhizophorae*) por *Cryptosporidium* e *Giardia* foi documentada neste estudo, representando o primeiro relato destes protozoários em ostras no Brasil e também na América Latina.
8. A análise do número de protozoários bioacumulados por animal em situação natural de contaminação revelou no caso de *Cryptosporidium* 12 oocistos/animal e 50 cistos de *Giardia*/animal, sendo que este número é considerado suficiente para causar infecções em seres humanos e representa um risco à saúde, sobretudo para populações imunodeficientes ou imunossuprimidas, quando estes alimentos são ingeridos crus.

9. A introdução do surfactante Tween 80 na etapa de homogeneização dos tecidos dos bivalves, auxiliou na remoção de uma quantidade significativa de lipídeos e material mucoso, facilitando a visualização dos protozoários e também acarretou em uma boa eficiência de recuperação destes protozoários a partir do homogenado tecidual de um “pool” de moluscos (n=10).
  
10. A sensibilidade da técnica empregada para a detecção de cistos e oocistos, avaliada mediante ensaios de exposição dos moluscos aos protozoários em aquário artificialmente contaminado, foi de 84,0 % para *Cryptosporidium* e 40,0 % para *Giardia*.
  
11. Considerados em conjunto, os achados na água do rio, mar e em moluscos bivalves destinados ao consumo humano neste estudo revelam que a contaminação por ambos os protozoários está amplamente dispersa no ambiente de estuário da Praia do Camaroeiro.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin. Microbiol. Rev.** **14**: 447-475, 2001.
- ALI, S. A.; HILL, D. R.; *Giardia intestinalis*. **Curr. Opin. Infect. Dis.** **16**: 453-460, 2003.
- ALM, E. W.; BURKE, J.; SPAIN, A. Fecal bacteria indicator are abundant in wet sand at freshwater beaches. **Water. Res.** **37 (16)**: 3978-3982, 2003.
- APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – Current status and future needs. **Trends. Parasitol.** **21 (8)**: 370-376, 2005.
- ATHERHOLT, T. T. B.; LeCHEVALIER, M. W.; NORTON, W. D.; ROSEN, J. S. Effect of rainfall on *Giardia* and *Cryptosporidium*. **J. AWWA.** **90**: 66-80, 1998.
- BIFULCO, J. M.; SCHAEFER, III. F. W. Antibody-Magnetite method for selective concentration of *Giardia lamblia* cysts from water samples. **Appl. Environ. Microbiol.** **59**: 772-776, 1993.
- BOFFI, A. V. **Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico**. Hucitec, São Paulo. 1979. 54p.
- BORGHETTI, J. R.; OSTRENSKY, A. A. Cadeia produtiva da aqüicultura brasileira. In: VALENTI, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. **Aqüicultura no Brasil**. Brasília: CNPq, 2000. p. 107- 142.
- BRADFORD, S. A.; SCHIJVEN, J. Release of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calf manure: impact of solution salinity. **Environ. Sci. Technol.** **36**: 3916-3923, 2002.
- BRANDINI, F. P.; SILVA, A. S.; PROENÇA, L. A. O. Oceanografia e maricultura. In: VALENTI, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. **Aqüicultura no Brasil**. Brasília: CNPq, 2000. p. 73-106.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução Nº. 274 de 29 de novembro de 2000**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27400.html>>. Acesso em: 20 mar. 2008.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução Nº. 357 de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2008.

- BROOKES, J. D.; ANTENUCCI, J.; HIPSEY, M.; MICHAEL, D. BURCH.; ASHBOLT, N. J.; FERGUSON, C. Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs. **Environ. Internat.** **30**: 741-759, 2004.
- BUKHARI, Z.; McCUIN, R. M.; FRICKER, C. R.; CLANCY, J. L. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. **Appl. Environ. Microbiol.** **64 (11)**: 4495-4499, 1998.
- BURET, A. G.; MITCHELL, K.; MUENCH, D. G.; SCOTT, K. G. E. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. **Parasitol.** **125**: 11-19, 2002.
- CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C. A.; McLAUHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends. Parasitol.** **21 (9)**: 430-436, 2005.
- CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R. M. B.; SANTOS, L. U. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at sludge treatment plant in Campinas, south east of Brazil. **Wat. Sci. Tech.** **54 (3)**: 89-94, 2006.
- CARAGUATATUBA. (2007). **Prefeito de Caraguatatuba recebe maricultores para apresentar o projeto trilha turística do mexilhão.** Disponível em: <<http://www.caraguatatuba.sp.gov.br/noticias.php?cdn=1308>> Acesso em: 16 Abr. 2007.
- CARPENTER, C.; FAYER, R.; TROUT, J.; BEACH, M. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. **Emerg. Infect. Dis.** **5**: 579-584, 1999.
- CARRARO, E.; FEA, E.; SALVA, S.; GILLI, G. Impact of wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in a surface water. **Wat. Sci. Tech.** **41**: 31-37, 2000.
- CARVALHO-ALMEIDA, T. T.; PINTO, P. L.; QUADROS, C. M. TORRES, D. M. KANAMURA, H. Y. CASIMIRO, A, M. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** **48 (1)**: 27-32, 2006.
- CEBER, K.; ASLAN, G.; OTAG, F.; DELIALIOGLU, N.; OZTURK, C.; BABUR, C.; EMEKDAS, G. Investigation of *Cryptosporidium* spp. oocysts in tap water, well water, sewage water and sea water in Mersin, Turkey. **Turkiye Parazitoloji Dergisi** **29**: 224-228, 2005.
- CHALMERS, R. M.; STURDEE, A. P.; MELLORS, P.; NICHOLSON, V.; LAWLOR, F.; KENNY, F.; TIMPSON, P. *Cryptosporidium parvum* in environmental

- samples in the Sligo area, Republic of Ireland: a preliminary report. **Letters. Appl. Microbiol.** **25**: 380 - 384, 1997.
- CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B.; LEWI, D. S. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome in Brazil. **Int. J. Infect. Dis.** **3 (4)**: 203-206, 1999.
- COELHO, C. HEINERT, A. P.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, C. R. M. Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription polymerase chain reaction. **J. Food. Prot.** **66**: 507-511, 2003.
- COLLIINS, M. V.; FLICK, G. J.; SMITH, S. A.; FAYER, R.; RUBENDALL, E.; LINDSAY, D. S. The effect of E-beam irradiation and microwave energy on Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*) experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. **J. Eukaryotic. Microbiol** **52**: 484-488, 2005.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Programa de monitoramento das praias do Estado de São Paulo.** Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/praias\\_litoraneas.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/praias_litoraneas.asp)>. Acesso em: 15 abr. 2006.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Monitoramento de cursos de água afluentes às praias.** Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/monitoramento.asp>>. Acesso em: 15 abr. 2006.
- COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO (SABESP) 2006 In: **Plano diretor da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo; Período de 2007-2011.**
- COOPERATIVE RESEARCH CENTRE FOR WATER QUALITY AND TREATMENT. (2005). **Cryptosporidium genotyping and infectivity analysis.** Australia. Disponível em <[www.waterquality.crc.org.au/dwfacts/techfact\\_crypto\\_genoinfect.pdf](http://www.waterquality.crc.org.au/dwfacts/techfact_crypto_genoinfect.pdf)> Acesso em: 13 Mar. 2007.
- COULLIETTE, A. D.; HUFFMAN, D. E.; SLIFKO, T.R.; ROSE, J. B. *Cryptosporidium parvum*: treatment effects and the rate of decline in oocyst infectivity. **J. Parasitol** **92**: 58-62, 2006.
- CRAUN, G. F. Waterborne giardiasis. In MEYER, E. A. (Ed.). **Giardiasis.** 1ªed. Amsterdam: Elsevier 3: (5): 267-293, 1990.

- CRAUN, G. F.; CALDERON, R. L.; CRAUN, M. F.; Outbreaks associated with recreational water in the United States. **Int. J. Environ. Health. Res.** **15 (4)**: 243-262, 2005.
- CRUZ, A.; SOUSA, M. I.; AZEREDO, Z.; LEITE, E.; FIGUEIREDO de SOUZA, J. C.; CABRAL, M. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: in vitro susceptibility to metronidazole and albendazole. **J. Antimicrob. Chemother.** **51**: 1017-1020, 2003.
- CURRIERO, F. C.; PATZ, J. A.; ROSE, J. B.; LELE, S. The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States. **Am. J. Public. Health.** **91**:1948-1994, 2001.
- DAI, X.; BOLL, J.; HAYES, M. E. ASTON, D. E. Adhesion of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to solid surfaces: the role of surface charge and hydrophobicity. **Coll. Surf. B. Bioint.** **34**: 259-263, 2004.
- DAWSON, D. Foodborne protozoan parasites. **Int. J. Food. Microbiol.** **103**: 207-227, 2005.
- De SILVA, S. S. Mussel and oyster culture in the tropics. **Tropical Mariculture.** 1st ed. Academic Press: 1998. p. 309-360.
- DENG, M.; PETERSON, R. P.; CLIVER, D. O. First findings of *Cryptosporidium* and *Giardia* in California Sea Lions (*Zalophus californianus*). **J. Parasitol.** **86**: 490-494, 2000.
- DILLINGHAM, R. A.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes. Infect.** **4**: 1059-1066, 2002.
- DWIGHT, R. H.; SEMENZA, J. C.; BAKER, D. B.; OLSON, B. H. Association of urban runoff with a coastal water quality in orange country, California. **Wat. Environ. Res.** **74**: 82-90, 2002.
- DOBELL, C. The discovery of intestinal protozoa of man. **Proc. R. Soc. Med.** **13**: 1-15, 1920.
- FARTHING, M. J. Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. **Nat. Clin. Prat. Gastroenterol. Hepatol.** **3**: 436-445, 2006.
- FAYER, R.; SPEER, C. A. DUBEY, J. P. The general biology of *Cryptosporidium*. In: FAYER, R. (Ed.) **Cryptosporidium and Cryptosporidiosis**. CRC press, ed. Boca Raton. Florida, 1997. p. 1-42.
- FAYER, R.; TROUT, J. M.; FARLEY, C. A.; LEWIS, E. J.; GRACZYK, T.K. Potential role of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in the epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. **Appl. Environ. Microbiol.** **63**: 2086- 2088, 1997.

- FAYER, R.; GRACZYK, T.K.; LEWIS, E.J. TROUT, J.M. e FARLEY,C.A. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. **Appl. Environ. Microbiol.** **64**: 1070-1074, 1998a.
- FAYER, R.; TROUT, J. M.; JENKINS, M. C.; Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperature. **J. Parasitol.** **84**: 1165-1169, 1998b.
- FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection, and identification. **Int. J. Parasitol.** **30**: 1305-1322, 2000a.
- FAYER, R; TROUT, J. M.; WALSH, E.; COLE, R. Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*. **J. Eukaryot. Microbiol.** **47**: 161-163, 2000b.
- FAYER, R.; TROUT, J. M.; LEWIS, E. J.; XIAO, L.; LAL, A.; JENKINS, M. C. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. **Parasitol. Res.** **88**: 998-1003, 2002.
- FAYER, R.; TROUT, J. M.; LEWIS, E. J.; SANTIN, M.; ZHOU, L.; LAL, A. A. e XIAO, L. Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. **Parasitol. Res.** **89**: 141- 145, 2003.
- FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends. Parasitol.** **20 (11)**: 531- 536, 2004a.
- FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Vet. Parasitol.** **126**: 37-56, 2004b.
- FAYER, R.; LINDSAY, D. Zoonotic protozoa in the marine environment: a threat to aquatic mammals and public health. **Vet. Parasitol.** **125**: 131-135, 2004.
- FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Vet. Parasitol.** **156**: 191-198, 2008.
- FERGUSON, C. M.; COOTE, B. G.; ASHBOLT, N. J.; STEVENSON, I. M. Relationships between indicators, pathogens, and water quality in a estuarine system. **Wat. Res.** **30**: 2045-2054, 1996.
- FILICE, F. P. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. **Unif. Califi. Publ. Zool.** **57**: 53-146, 1952.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Yearbook of Fishery Statistics Summary tables (PDF) 2005**. World aquaculture production of fish, crustaceans, molluscs, etc., by principal producers in 2005. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/fi/STAT/summary/a-4.pdf>>. Acesso em: 29 Nov. 2007.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Yearbook of Fishery Statistics Summary tables (PDF) 2005**. World aquaculture production of fish, crustaceans, molluscs, etc., by principal species in 2005. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/fi/STAT/summary/a-6.pdf>>. Acesso em: 29 Nov. 2007.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO-NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** **43**: 109-111, 2001.

FRANCO, R. M. B. CORDEIRO, N. S. Giardiose e Criptosporidiose em creches no município de Campinas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **29**: 585-591, 1996.

FRANCO, R. M. B. Protozoários patogênicos de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Rev. Pan. Infect.** **9 (4)**: 36-43, 2007.

FREIRE-SANTOS, F.; OTEIZA-LOPEZ, A. M.; VERGARA-CASTIBLANCO, C. A.; ARES-MAZÁS, M. E. Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. **Vet. Parasitol.** **87**: 1-7, 1999.

FREIRE-SANTOS, F.; OTEIZA-LOPEZ, A. M.; VERGARA-CASTIBLANCO, C. A.; ARES-MAZÁS, M. E. Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques. **Vet. Parasitol.** **89**: 253-259, 2000a.

FREIRE-SANTOS, F.; OTEIZA-LOPEZ, A. M.; VERGARA-CASTIBLANCO, C. A.; ARES-MAZÁS, M. E.; ÁLVAREZ-SUÁVEZ, E. GARCÍA-MARTÍN, O. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. **J. Parasitol.** **86**: 853- 854, 2000b.

FREIRE-SANTOS, F.; OTEIZA-LOPEZ, A. M.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; GARCÍA-MARTÍN, O. ARES-MAZAS, M. E.; Viability and infectivity of oocysts recovered from clams, *Ruditapes philippinarum*, experimentally contaminated with *Cryptosporidium parvum*. **Parasitol. Res.** **87**: 428-430, 2001.

FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS (FGV). **Metade do país não tem esgoto**. Disponível em: <[http://www3.fgv.br/ibrecps/CPS\\_infra/midia/jc1406.pdf](http://www3.fgv.br/ibrecps/CPS_infra/midia/jc1406.pdf)>. Acesso em: 02 Mar. 2008.

- GARDNER, T. B.; HILL, D. R. Treatment of giardiasis. **Clin. Microbiol. Rev.** **14**: 114-128, 2001.
- GENNARI-CARDOSO, M. L.; COSTA-CRUZ, J. M.; de CASTRO, E.; LIMA, L. M.; PRUDENTE, D. V. *Cryptosporidium* sp. in children suffering from acute diarrhea at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **91**: 551-554, 1996.
- GERBA, C. P. SMITH JR, J. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during application of wastes. **J. Environ. Qual.** **34**: 42-48, 2005.
- GIANGASPERO, A.; MOLINI, U.; IORIO, R.; TRAVERSA, D.; PAOLETTI, B.; GIANSANTE, C. *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater clams (*Chamelea gallina*) in Italy. **Prev. Vet. Med.** **69**: 203-212, 2005.
- GOH, S.; REACHER, M.; CASEMORE, D. P.; VERLANDER, N. Q.; CHALMERS, R.; KNOWLES, M.; WILLIAMS, J.; OSBORN, K.; RICHARDS, S. Sporadic cryptosporidiosis, North Cumbria, England, 1996-2000. **Emerg. Infect. Dis.** **10**: 1007-1015, 2004.
- GOLDFARB, J.; TANNOWITZ, H.; GROSSNER, R.; BONANNO, C.; KAUFMAN, D.; MA, P. Cryptosporidiosis: assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Morbid. Mortal. Weekly. Rep.** **31**: 589-591, 1982.
- GÓMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-NORA, L. M.; TABARES, E.; LOPES-RODAS, V. COSTAS, E. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). **Appl. Environ. Microbiol.** **66** (5): 1866- 1870, 2000.
- GÓMEZ-COUSO, H.; FREIRE-SANTOS, F.; MARTINEZ-URTAZA, J.; GARCIA-MARTIN, O.; MAZAS, M. E. Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. **Int. J. Food. Microbiol.** **87**: 97- 105, 2003.
- GÓMEZ-COUSO, H.; FREIRE-SANTOS, F.; AMAR, C. F. L.; GRANT, K.A.; WILLIANSON, K.; ARES-MAZÁS, M. E. McLAUCHLIN, J. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. **Int. J. Food. Microbiol.** **91**: 279- 288, 2004.
- GÓMEZ-COUSO, H.; MENDEZ-HERMIDA, F.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; ARES-MAZÁS, E. *Giardia* in shellfish-farming areas: detection in mussels, river water and waste waters. **Vet. Parasitol.** **133**: 13-18, 2005a.
- GÓMEZ-COUSO, H.; MENDÉZ-HERMIDA, F.; CASTRO-HERMIDA, J. A.; ARES-MAZÁS, E. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. **J. Food. Prot.** **69**: 185-190, 2006a.

- GÓMEZ-COUSO, H.; MENDEZ-HERMIDA, F.; ARES-MÁZAS, E. Levels of detection of *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by IFA and PCR methods. **Vet. Parasitol.** **141**: 60-65, 2006b.
- GÓMEZ-COUSO, H.; MENDEZ-HERMIDA, F.; CASTRO-HERMIDA, J. A. ARES-MÁZAS, E. Cooking mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by steam does not destroy the infectivity of *Cryptosporidium parvum*. **J. Food. Prot.** **69**: 948-950, 2006c.
- GOSLING, E. **Bivalve molluscs: Biology, ecology, and culture fishing.** New Books, 2003. 443p.
- GRACZYK, T. K., FAYER, R., CRANFIELD, M. R.; CONN, D. B. *In vitro* interactions of Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*) hemocytes and *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.** **63**: 2910-2912, 1997a.
- GRACZYK, T. K., FAYER, R., LEWIS, E. J., FARLEY, C. A.; TROUT, J. M. *In vitro* interactions between hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) Gmelin, 1791 and *Cryptosporidium parvum* oocysts. **J. Parasitol.** **83**: 949-952, 1997b
- GRACZYK, T. K.; FAYER, R.; CRANFIELD, M. R.; CONN, D. B. Recovery of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts by freshwater benthic clams (*Corbicula fluminea*). **Appl. Environ. Microbiol.** **64** (2): 427- 430, 1998.
- GRACZYK, T. K.; FAYER, R.; LEWIS, E. J., TROUT, J. M.; FARLEY, C. A. *Cryptosporidium* oocysts in Bent Mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. **Parasitol. Res.** **85**: 518-521, 1999.
- GRACZYK, T. K.; CONN, D. B.; MARCOGLIESE, D. J.; GRACZYK, H.; De LAFONTAINE, Y. Accumulation of human waterborne parasites by Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). **Parasitol. Res.** **89**: 107-112, 2003.
- GRACZYK, T. K.; GIROUARD, A. S.; TAMANG, L.; NAPPIER, S. P. SCHWAB, K. J. Recovery, accumulation and inactivation of human waterborne pathogens by the Chesapeake Bay nonnative oyster (*Crassostrea ariakensis*). **Appl. Environ. Microbiol.** **72**: 3390-3395, 2006.
- GRACZYK, T. K.; LEWIS, E.J.; GLASS, G.; DA SILVA, A. J.; TAMANG, L.; GIROUARD, A. S. Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake bay. **Parasitol. Res.** **100**: 247-253, 2007a.

- GRACZYK, T. K.; MAJEWSKA A. C.; SCHWAB, K. J. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. **Trends. Parasitol.** **24** (2): 55-59, 2007b.
- GRIFFITHS, J. K. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis. **Adv. Parasitol.** **40**: 37-85, 1998.
- GUIDEBOOK TO GLOBAL WATER ISSUES (ITT Industries). **Countries experiencing water scarcity in 1955, 1995 and 2025 (projected), based on availability of less than 1,000 cubicmeters renewable water per person per year.** Disponível em: <[www.itt.com/waterbook/intl\\_scarcity.asp](http://www.itt.com/waterbook/intl_scarcity.asp)> Acesso em: 01 Mar. 2008.
- HAILE, R. W.; WITTE, J. S. GOLD, M. CRESSEY, R.; McGEE, C.; MILLIKAN, R. C.; GLASSER, A.; HARAWA, N.; ERVIN, C.; HARMON, P.; HARPER, J.; DERMAND, J.; ALAMILLO, J.; BARRETT, K.; NIDES, M.; WANG, G. The health effects of swimming in ocean water contaminated by storm drain runoff. **Epidemiol.** **10**: 355-363, 1999.
- HANEVICK, K.; HAUSKEN, T.; MORKEN, M. H.; STRAND, E. A.; MORCH, K.; COLL, P.; HELGELAND, L.; LANGELAND, N. Persisting symptoms and duodenal inflammation related to *Giardia duodenalis* infection. **J. Infect.** **56**: 524-530, 2007.
- HAWKINS, P. R.; SWANSON, P.; WARNECKE, M.; SHANKER, S. R.; NICHOLSON, C. Understanding the fate of *Cryptosporidium* and *Giardia* in storage reservoirs: a legacy of Sidney's water contamination incident. **Aqua. (Oxford)** **49** (6): 289-306, 2000.
- HELLARD, M. E.; SINCLAIR, M. I. HOGG, G. G.; FAIRLEY, C. K. Prevalence of enteric pathogens among community based asymptomatic individuals. **Gastroenterol. Hepatol** **15**: 290-293, 2000.
- HILL, B. D.; FRASER, I. R. PRIOR, H. C. *Cryptosporidium* infection in a Dugong (*Dugong dugon*). **Aust. Vet. J.** **75**: 670-671, 1997.
- HO, B. S. W.; TAM, T. Y. Occurrences of *Giardia* cysts in beach water. **Wat. Sci. Tech.** **38**: 73-76, 1998a.
- HO, B. S. W e TAM, T. Y. *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage-contaminated river waters. **Wat. Res.** **32**: 2860-2864, 1998b.
- HSU, B., HUANG, C.; HSU, C. L.; HSU, Y. F.; YEH, J. H. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in the Kau-Ping river and its watershed in Southern Taiwan. **Wat. Res.** **33**: 2701-2707, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico** (2000). Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoadevida/pnsb/esgotamento\\_sanitario/esg\\_sanitario50.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoadevida/pnsb/esgotamento_sanitario/esg_sanitario50.shtm)> Acesso em: 20 Jan. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Contagem da População Segundo os Municípios**. (2007). Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/SP.pdf>>. Acesso em: 15 Maio. 2008.

JABUR, P.; MIORIN, L. A.; SILVA, H. G. C.; PASCHOALOTTI, M. A.; CHIEFFI, F. F.; SENS, Y. A. S. Criptosporidiose e outras enteroparasitoses em pacientes submetidos a transplante renal ou hemodiálise. **J. Bras. Nefrol** **18 (3)**: 239-242, 1996.

JOHNSON, D. C.; REYNOLDS, K. A.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L.; ROSE, J. B. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. **Wat. Sci. Tech.** **31**: 439-442, 1995.

KAPLAN, J. E.; HANSON, D.; DWORKIN, M. S. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. **Clin. Infect. Dis.** **30**: 5-14, 2000.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **J. Wat. Health.** **5**: 1-38, 2007.

KAY, D.; WYER, M.; CROWTHER, J.; STAPLETON, C.; BRADFORD, M.; McDONALD, A.; GREAVES, J.; FRANCIS, C.; WATKINS, J. Predicting faecal indicator fluxes using digital land use data in the UK's sentinel water framework Directive catchment: the Ribble study. **Wat. Res.** **39**: 3967-3981, 2005.

KING, B. J.; KEEGAN, A. R.; MONIS, P. T.; SAINT, C. P. Environmental temperatures controls *Cryptosporidium* oocysts metabolic rate and associated retention of infectivity. **Appl. Environ. Microbiol.** **71**: 3848-3857, 2005.

KISTEMANN, T.; CLABEN, T.; KOCH, C.; DANGERDORF, F.; FISCHEDER, R.; GEBEL, J.; VACATA, V.; EXNER, M. Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. **Appl. Environ. Microbiol.** **68**: 2188-2197, 2002.

KOSEC, M.; ALCANTARA, C.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: an update. **Infect. Dis.** **1**: 262-269, 2001.

LANE, S.; LLOYD, D. Current trends in research into the waterborne *Giardia*. **Crit. Rev. Microbiol.** **28 (2)**: 123-147, 2002.

- LAZAROVA, V.; SAVOYE, P.; JANEX, M. L. Wastewater disinfection by low-pressure UV and ozone: a design approach based on water quality. **Wat. Sci. Tech.** **43 (10)**: 163- 171, 2001.
- LEAL, D. A. G.; PEREIRA, M. A.; FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N. Padronização de uma técnica para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em moluscos bivalves usualmente ingeridos crus. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, Porto Alegre RS. (Menção Honrosa). **Rev. Patol. Trop.** **34**.
- LEAL, D. A. G., PEREIRA, M. A.; FRANCO, R. M. B., BRANCO, N.; CANTUSIO-NETO, R. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil. **J. Wat. Health.** **6**: 527-532, 2008.
- LEAL, D. A. G.; FRANCO, R. M. B. Moluscos Bivalves Destinados ao Consumo Humano como Vetores de Protozoários Patogênicos: Metodologias de Detecção e Normas de Controle. **Rev. Pan. Infect.** (no prelo).
- LeCHEVALIER, M. W.; NORTON, W. D.; LEE, R. G.; Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. **Appl. Environ. Microbiol.** **57**: 2610-2616, 1991.
- LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COS, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, III. J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the protozoa. **J. Protozool.** **27**: 37-58, 1980.
- LEVINE, N. D. **The protozoan Phylum Apicomplexa.** . Vol. I e II. CRC Press, Inc., ed Boca Raton, Florida. 1988.
- LI, X.; GUYOT, K.; DEI-CAS, E.; MALLARD, J. P.; BALLEST, J. J. BRASSEUR, P. *Cryptosporidium* oocysts in mussels, (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). **Int. J. Food. Microbiol.** **108**: 321-325, 2006.
- LINDQUIST, A.; DUFOUR, A. P. WYMER, L. J. SCHAEFER III, F. W. Criteria for evaluation of proposed protozoan detection methods. **J. Microbiol. Methods** **37**: 33-43, 1999.
- LIPP, E. K.; FARRAH, S.A.; ROSE, J.B. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. **Mar. Pol. Bull.** **42 (4)**: 286-293, 2001a.
- LIPP, E. K.; KURZ, R.; VINCENT, R.; RODRIGUEZ-PALACIOS, C.; FARRAH, S. A.; ROSE, J. B. The effects of seasonal variability and weather on microbial

- fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. **Estuaries**. **24**: 266- 276, 2001b.
- LISLE, J. T.; ROSE, J. B. *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and UK – a mini review. **Aqua**. **44 (3)**: 103 117, 1995.
- LOUREIRO, E.C.B.; LINHARES, A. C.; MATA, L. Cryptosporidiosis in children from 2 year of age, with acute diarrhea in Belém, Pará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. **84**: 117-122, 1990.
- LOWERY, C. J.; NUGENT, P.; MOORE, J.E.; MILLAR, B. C.; XIRU, X.; DOOLEY, JSG. PCR-IMS detection and molecular typing of *Cryptosporidium parvum* recovered from a recreational river source and an associated mussel (*Mytilus edulis*) bed in Northern Ireland. **Epidemiol. Infect.** **127**: 545-553, 2001.
- MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIR, K. A.; PETERSON , D. E.; KAZMERCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. B.; DAVIS, J. P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **N. Engl. J. Med.** **331**: 161-167, 1994
- MANCUSO, P. C. S.; SANTOS, H. F. **Reuso de água**. 1ª ed. São Paulo. Editora Manole; 2003. 579p.
- MANGINI, A. C. S.; DIAS, R. M. D. S.; GRISI, S. J. F. F.; ESCOBAR, A. M.; TORRES, D. M. A. G. V.; ZUBA, I. P. R.; QUADROS, C. M. S.; CHIEFFI, P. P. *Cryptosporidium* parasitism in children with acute diarrhea. **Rev. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**. **34**: 341-345, 1992.
- McLAUHLIN, J.; PEDRAZA-DIAZ, S.; MAR-HOETZENEDER, C.; NICHOLS, G. L. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. **J. Clin. Microbiol.** **37**: 3153-3158,1999.
- McLAUHLIN, J.; AMAR, C.; PEDRAZA-DIAZ, S.; NICHOLS, G. L. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. **J. Clin. Microbiol.** **38**: 3984-3990, 2000.
- MEAD, J. R. Cryptosporidiosis and the challenges of chemotherapy. **Drug. Resistance Updates** **5**: 47-57, 2002.
- MEASURES, L. N.; OLSON, M. E. Giardiasis in pinnipeds from eastern Canada. **J. Wildl. Dis.** **35**: 779-782, 1999.

- MEISEL, J. L.; PERERA, D. R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in a immunosupressed patient. **Gastroenterol.** **70**: 1156-1160, 1976.
- MELO B. Produção de molusco será rastreada. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 4 Jul. 2007. Caderno Agrícola. p. 3.
- MÉNDEZ-HERMIDA, F. GÓMEZ-COUSO, H.; ROMERO-SUANCES, R.; ARES-MAZÁS, E. *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild otters (*Lutra lutra*). **Vet. Parasitol.** **144**: 153-156, 2007a.
- MÉNDEZ-HERMIDA, F. GÓMEZ-COUSO, H.; ARES-MAZÁS, E. Possible involvement of artemia as live diet in the transmission of cryptosporidiosis in cultured fish. **Parasitol. Res.** **101**: 823-827, 2007b.
- MILLER JUNIOR, G. T. **Ciência ambiental (environmental science)** 11<sup>a</sup>ed. Thompson learning, 2007.
- MILLER, W.A.; ATWILL, E. R.; GARDNER, I. A.; MILLER, M. A.; FRITZ, H. M.; HEDRICK, R. P.; MELLI, A. C.; BARNES, N. M.; CONRAD, P. A. Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. **Int. J. Parasitol.** **35**: 673- 684, 2005a.
- MILLER, W. A.; MILLER, M. A.; GARDNER, L. A.; ATWILL, E. R.; HARRIS, M.; AMES, J. JESSUP, D.; MELLI, A.; PARADIES, D.; WORCESTER, K.; OLIN, P.; BARNES, N.; CONRAD, P. A. New genotypes and factors associated with *Cryptosporidium* detection in mussels (*Mytilus* spp.) along the California coast. **Int. J. Parasitol.** **35**: 1103-1113, 2005b.
- MILLER, W. A., GARDNER, I. A., ATWILL, E. R., LEUTENEGGER, C. M.; MILLER, M. A., MELLI, A. C.; BARNES, N. M.; CONRAD, P. A. Evaluation of methods for improved detection of *Cryptosporidium* spp. in mussels (*Mytilus californianus*) **J. Microbiol. Methods.** **65**: 367-379, 2006.
- MOLNAR, J. J. **Small scale aquaculture as a sustainable rural livelihood: a global perspective.** In: X world congress of rural sociology. 2000. Rio de Janeiro RJ.
- MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infect. Gen. Evol.** **3**: 233-244, 2003.
- MORGAN, U. M.; PALLANT, L.; DWYER, B. W.; FORBES, D. A.; RICH, G.; THOMPSON, R. C. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. **J. Clin. Microbiol.** **36**: 995-998, 1998.

- MORGAN, U.; WEBER, R.; XIAO, L.; SULAIMAN, I.; THOMPSON, R. C. A.; NDIRITU, W.; LAL, A.; MOORE, A.; DEPLAZES, P. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. **J. Clin. Microbiol** **38** (3): 1180-1183, 2000.
- MORGAN, U. M.; XIAO, L.; HILL, B. D.; O' DONOGHUE, P. E.; LIMOR, J.; LAL, A.; THOMPSON, R. C. A. Detection of the *Cryptosporidium parvum* "human" genotype in a Dugong (*Dugong dugon*). **J. Parasitol.** **86**: 1352-1354, 2000.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. NIAID **Category A, B, C Priority Pathogens.** Disponível em: <<http://www3.niaid.nih.gov/topics/BiodefenseRelated/Biodefense/research/CatA.htm>> Acesso em: 15 Mar. 2008.
- NASCIMENTO, I. A. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck) in South and Central America. In: MENZEL, W. (Ed.) **Estuarine and marine bivalve mollusk culture.** CRC Press, Boca Raton, Flórida, 1991.
- NAVIN, T. R.; WEBER, D. J.; VUGIA, D.; RIMLAND, J. M.; ROBERTS, D. G.; ADDISS, G. S.; VISVESVARA, S. P.; WAHLQUIST, S. E.; HOGAN, L. E.; GALLAGHER, D. D.; JURANEK, D. A.; SCHWARTZ, C. M.; WILCOX, J. M.; STEWART, S. E.; THOMPSON, III. BRYAN, R. T. Declining CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte counts are associated with increased risk of enteric parasitosis and chronic diarrhea: results of a 3-year longitudinal study. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.** **20**: 154-159, 1999.
- NEGM, A. Y. Human pathogenic protozoa in bivalves collected from local markets in Alexandria. **J. Egyptian. Soc. Parasitol.** **33**: 991-998, 2003.
- NIME, F. A.; BUREK, J. D.; PAGE, D. L.; HOLSCHER, M. A.; YARDLEY, J. H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterol.** **70**: 592-598, 1976.
- O'CONNOR, T. P. National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. **Mar. Environ. Res.** **53**: 117-143, 2002.
- OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L.; CRABB, J. H.; STERLING, C. R.; DuPONT, H. L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for health adults. **J. Infect. Dis.** **180**: 1275-1281, 1999.
- OLIVARES, J. L.; FERNÁNDEZ, R.; FLETA, J.; RUIZ, M. Y.; CLAVEL, A. Vitamin B<sub>12</sub> and folic acid in children with intestinal parasitic infection. **J. Am. Coll. Nutr.** **21** (2): 109-113, 2002.

- OLIVEIRA, P. W. **Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no rio Atibaia, Bacia do rio Piracicaba, Campinas, São Paulo, Brasil.** 2005. 87f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas.
- OLIVEIRA, A. J. F. C.; WATANABE PINHATA, J. M. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in southeastern Brazil. **Water. Res.** **42**: 2242-2250, 2008.
- OLSON, M. E.; ROACH, P. D.; STABLER, M.; CHAN, W. Giardiasis in ringed seals from the western arctic. **J. Wildl. Dis.** **33**: 646-648, 1997
- ORTEGA, Y. R.; ADAM, R. D.; *Giardia*: overview and update. **Clin. Infect. Dis.** **25**: 545-549, 1997.
- OSHIRO, E. T.; DORVAL, M. E. C.; NUNES, V. L. B.; SILVA, M. A. A.; SAID, L. A. M. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* among children of less than 5 years of age in the urban zone of Campo Grande, Mato Grosso do Sul state Brazil, 1996. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **33**: 277-280, 2000.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. Água e aqüicultura. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B. TUNDISI, J. G. (Eds) **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação.** 3. ed. São Paulo: Escrituras Editora; 2006. p. 579-605.
- OTTOSON, J. HANSEN, A.; BJÖRLENIUS, B.; NORDER, H.; STENSTRÖM, T. A. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. **Wat. Res.** **40**: 1449-1457, 2006.
- PASCALICCHIO, A. E. **Contaminação por metais pesados- saúde pública e medicina ortomolecular.** 1ª ed. São Paulo: Editora Annablume; 2000. 132p.
- PAULILO, M. I. S. Maricultura e território em Santa Catarina. **Cadernos de pesquisa.** Disponível em: <<http://www.sociologia.ufsc.br/cadernos/Cadernos%20PPGSP%2031.pdf>> Acesso em: 10 Mar. 2008.
- PELCZAR JUNIOR, J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** Vol 2. 2ªed. Makron Books, São Paulo, 1996.
- PENG, M. M.; XIAO, L.; FREEMAN, A. R. ARROWOOD, M. J.; ESCALANTE, A. A.; WELTMAN, A. C.; ONG, C. S.; Mac KENZIE, W. R.; LAL, A. A.; BEARD, C. B. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. **Emerg. Infect. Dis.** **3**: 567-573, 1997.

- PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia marinha**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2002. 382p.
- PHILIPPI JUNIOR, A. **Saneamento, Saúde e Ambiente – Fundamentos Para Um Desenvolvimento Sustentável**. São Paulo: Manole; 2005. 842p.
- PIANETTI, A.; BRUSCOLINI, F.; SABATINE, L.; COLANTONI, P. Microbial characteristics of marine sediments in bathing areas along Pesaro-Gabicce coast (Italy): a preliminary study. **J. Appl. Microbiol.** **97**: 682-689, 2004.
- POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. **Clin. Infect. Dis.** **35**: 921- 928, 2002.
- RAMIREZ, N. E.; WARD, L. A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes. Infect.** **6**: 773-785, 2004.
- REBOUÇAS, A. C. Água Doce no Mundo e no Brasil. In: REBOUÇAS A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. (Org.). **Águas Doces no Brasil - Capital Ecológico, Uso e Conservação**. 3ª ed. São Paulo: Ed. Escrituras; 2006. p: 1-34.
- RENDTORFF, R. C. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. **Amer. J. Hyg.** **59**: 209-220, 1954.
- RIBEIRO, P. C.; PILE, E.; QUEIROZ, M. M. C.; NORBERG, A. N.; TENÓRIO, J. R. Cryptosporidiosis occurrence in HIV<sup>+</sup> patients attended in a hospital, Brazil. **Rev. Saúde. Pública** **38**: 469-470, 2004.
- RIOU, P.; Le SAUX, J. C. DUMAS, F.; CAPRAIS, M. P.; Le GUYADER, S. F.; POMMEPUY, M.; Microbial impact of small tributaries on water and shellfish quality in shallow coastal areas. **Wat. Res.** **41**: 2774- 2786, 2007.
- RIPPEY, S. R. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. **Clin. Microbiol. Rev.** **7**: 419-425, 1994.
- ROBERTSON, L. J.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B. K.; STRAND, E.; ALVSVAG, J. O.; LANGELAND, N. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. **Appl. Environ. Microbiol.** **72**: 2212-2217, 2006.
- ROBERTSON, L. J. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review. **Int. J. Food. Microbiol.** **120**: 201-216, 2007.

- ROBERTSON, L. J.; GJERDE, B. K. *Cryptosporidium* oocysts: challenging adversaries? **Trends. Parasitol.** **23 (8)**: 344-347, 2007.
- ROMPRÉ, A.; SERVAIS, P.; BAUDART, J.; de ROUBIN, M. R.; LAURENT, P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. **J. Microb. Meth.** **49**: 31-54, 2002.
- ROSE, J. B.; LISLE, J. T.; LeCHEVALLIER, M. Waterborne cryptosporidiosis: incidence outbreaks, and treatment strategies. In: FAYER, R (Ed.). ***Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis***. CRC press, ed. Boca Raton. Florida, 1997. p. 93-109.
- ROSE, J. B.; DAESCHNER, S.; EASTERLING, D.; CURRIERO, F.; LELE, S.; PATZ, J. Climate and waterborne disease outbreaks. **J. Am. Wat. W. Assoc.** **92**: 77-87, 2000.
- ROSE, J. B.; HUFFMAN, D. E.; GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **FEMS. Microbiol. Rev.** **26**: 113-123. 2002.
- RÖXSTROM-LINDQUIST, K.; PALM, D.; REINER, D.; RINGQVIST, E.; SVÄRD, S. G. *Giardia* immunity – an update. **Trends. Parasitol.** **22**: 26-31, 2006.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6ª ed. Roca São Paulo. 1029p.
- SANTOS, E. **Zoologia brasileira: moluscos do Brasil**. Itatiaia. Belo Horizonte.1982. p. 141.
- SANTA CATARINA. 2007. **Surto de diarreia suspende consumo de mexilhão**. Setembro 2007. Disponível em: <<http://noticias.terra.com/brasil/interna/0,,OI1920040-EI715,00.html>> Acesso em 21/09/07.
- SATO, M. I. Z, BARI, M. D.; LAMPARELLI, C. C.; TRUZZI, A. C.; COELHO, M. C. L. S.; HACHICH, E. M. Sanitary quality of marine recreational beaches of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** **36 (4)**: 321-326, 2005.
- SAUVÉ, S.; BROUSSEAU, P.; PELLERIN, J. MORIN, Y.; SENÉCAL, L.; GOUDREA, P.; FOURNIER, M. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). **Aquac. Toxic.** **58**: 189-200, 2000.
- SCHETS, F. M.; VAN DEN BERG, H. H.; ENGELS, G. B.; LODDER, W. J.; DE RODA HUSMAN, A. M. *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, The Netherlands. **Int. J. Food. Microbiol.** **113**: 189-194, 2007.

- SCOTT, K. G. E.; MEDDINGS, J. B.; KIRK, D. R.; LEES-MILLER, S. P.; BURET, A. G. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain Kinase-depedent fashion. **Gastroenterol.** **123**:1179-1190, 2002.
- SEARCY, K. E.; PACKMAN, A. I.; ATWILL, E. R.; HARTER, T. Association of *Cryptosporidium parvum* with suspended particles: impact on oocyst sedimentation. **Appl. Environ. Microbiol.** **71 (2)**: 1072-1078, 2005.
- SHUMWAY S. Mussels and public health. In: GOSLING, E. (Ed). **The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture**. Amsterdam, Elsevier; 1992. p. 511-542.
- SINCERO, T. C. M.; LEVIN, D. B.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, C. R. M. Detection of hepatitis A virus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*). **Wat Res** **40**: 895-902, 2006.
- SISTEMA DE MONITORAMENTO AGROMETEOROLÓGICO (AGRITEMPO)**. 2008. Disponível em: <<http://www.agritempo.gov.br/agroclima/sumario?uf=SP>>. Acesso em: Jul. 2006/ Jun. 2007 (mensalmente).
- SLIFKO, T. R.; SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **Int. J. Parasitol.** **30**: 1379- 1393, 2000.
- SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne cryptosporidiosis: current status. **Parasitol. Today.** **14**: 14-22, 1998.
- SMITH, H. V.; GRIMASON, A. M. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater. In: MARA, D.; HORAN, N. (eds.). **The Handbook of Water and Wastewater Microbiology**. Elsevier, 2003. p. 619-781.
- SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; TAIT, A.; McLAUHLIN, J.; THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends. Parasitol.** **22**: 160-167, 2006a.
- SMITH, A.; REACHER, M.; SMERDON, W.; ADAK, G. K.; NICHOLS, G.; CHALMERS, R. M. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Epidemiol. Infect.** **134**: 1141-1149, 2006b.
- SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. B. A.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Vet. Parasitol.** **149**: 29-40, 2007.
- SODRÉ, F. C.; FRANCO, R. M. B. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **Rev. Bras. An. Clín.** **33 (2)**: 97-106, 2001.

- STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER 2005. 21th edition, **American Public Health Association**, Washington DC.
- SULAIMAN, I. M.; XIAO, L.; YANG, L.; ESCALANTE, A.; MOORE, A.; BEARD, C. B.; LAL, A. A. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. **Emerg. Infect. Dis.** **4**: 681-685, 1998.
- SUNDERLAND, D.; GRACZYK, T. K.; TAMANG, L.; BREYSSE, P. N. Impact of bathers on levels of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts in recreational beach water. **Wat. Res.** **41**: 3483-3489, 2007.
- SUNNOTEL, O.; LOWERY, C. J.; MOORE, J. E.; DOOLEY, J. S. G.; XIAO, L.; MILLAR, B. C.; ROONEY, P. J.; SNELLING, W. J. Under the microscope, *Cryptosporidium*. **Lett. Appl. Microbiol.** **43**: 7-16, 2006.
- TAMBURRINI, A.; POZIO, E. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Int. J. Parasitol.** **29**: 711- 715, 1999.
- TANG, Y. W.; WANG, J. X. XU, Z. Y.; GUO, Y. F.; QIAN, W. H.; XU, J. X. A serologically confirmed, case control study, of a large outbreak of hepatitis A in China, associated with consumption of clams. **Epidemiol. Infect.** **107**: 651-657, 1991.
- THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet. Parasitol.** **126**: 15-35, 2004.
- THOMPSON, R. C. A.; MONIS, P. T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Adv. Parasitol.** **58**: 69-137, 2004.
- TYZZER, E. E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Assoc.** **5**: 12-13, 1907.
- TYZZER, E. E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **J. Med. Res.** **23**: 487-511, 1910.
- TYZZER, E. E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Arch. Protistenkd.** **26**: 394-412, 1912.
- TZIPORI, S. e WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis, and disease. **Microbes. Infect.** **4**: 1047-1058, 2002.
- U S ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Announcement of the drinking water contaminant candidate list: notice. **Fed. Regist.** **63**: 10272-10287, 1998.

U S ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Implementing the Beach Act of 2000**. Report to Congress. Washington DC 2006.

VINATEA, L. A. **Modos de apropriação e gestão patrimonial de recursos costeiros; estudo de caso sobre o potencial e os riscos do cultivo de moluscos marinhos na Baía de Florianópolis, Santa Catarina**. 2000. Tese Doutorado interdisciplinar de Ciências humanas. UFSC. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

WADE, T. J.; CALDERON, R. L.; SAMS, E.; BEACH, M.; BRENNER, K. P.; WILLIAMS, A. H. Rapidly measured indicators of recreational water quality are predictive of swimming-associated gastrointestinal illness. **Environ. Health Persp.** **114**: 24-28, 2006.

WIEDENMANN, A.; KRÜGER, P.; BOTZENHART, K. PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples- a review of published protocols and current developments. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** **21**: 150-166, 1998.

WITTMAN, R. J.; FLICK, G. J. Microbial contamination of shellfish: prevalence, risk to human health, and control strategies. **Annu. Rev. Public. Health.** **16**: 123-140. 1995

**WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**. Disponível em: <[www.who.int/en](http://www.who.int/en)> Acesso em 15 Mar. 2006.

YAKUB, G. P.; STADTERMAN-KNAUER, K. L. Evaluation of Immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high iron matrices. **Appl. Environ. Microbiol.** **66**: 3628-3631, 2000.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clin. Microbiol. Rev** **17 (1)**: 72-97, 2004.

## 9. Anexos

### 9.1: Anexo 1: Produção mundial aquícola de peixes, crustáceos e moluscos por principal produtor em 2005 (FAO).

World aquaculture production of fish, crustaceans, molluscs, etc., by principal producers in 2005  
 Production mondiale de l'aquaculture de poissons, crustacés, mollusques, etc., par producteurs principaux en 2005  
 Producción mundial de acuicultura de peces, crustáceos, moluscos, etc., por productores principales en 2005

Q = t  
 V = US\$'000

Country Pays País		1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
<b>World total</b>	<b>Q</b>	<b>26 592 071</b>	<b>28 606 058</b>	<b>30 487 319</b>	<b>33 380 978</b>	<b>35 477 447</b>	<b>37 955 183</b>	<b>40 388 872</b>	<b>42 682 153</b>	<b>45 924 282</b>	<b>48 149 792</b>
<b>Total mondial</b>	<b>V</b>	<b>41 789 327</b>	<b>44 298 283</b>	<b>44 556 557</b>	<b>47 648 617</b>	<b>51 108 513</b>	<b>53 007 896</b>	<b>54 988 674</b>	<b>59 103 981</b>	<b>64 604 553</b>	<b>70 928 803</b>
<b>Total mundial</b>											
China	Q	17 714 570	19 315 623	20 795 367	22 789 887	24 580 671	26 050 101	27 767 251	28 883 642	30 612 602	32 414 084
	V	18 272 012	20 356 070	21 559 305	22 631 659	24 317 140	26 445 691	28 824 296	29 873 773	30 867 155	34 550 118
India	Q	1 758 739	1 864 322	1 908 485	2 134 814	1 942 204	2 119 839	2 187 189	2 312 971	2 794 636	2 837 751
	V	1 872 489	2 132 553	2 253 581	2 509 328	2 511 179	2 392 401	2 574 584	2 588 468	3 783 944	3 921 449
Viet Nam	Q	299 288	322 378	338 920	398 468	496 517	588 098	703 041	937 502	1 198 617	1 437 300
	V	643 571	676 716	717 281	737 028	991 318	1 345 713	1 599 449	1 968 331	2 443 589	2 930 650
Indonesia	Q	733 098	662 547	629 797	749 269	788 500	864 276	914 071	998 659	1 045 051	1 197 109
	V	2 165 011	2 051 972	1 809 865	2 187 545	2 245 695	2 397 368	1 457 894	1 698 843	1 993 240	1 999 246
Thailand	Q	556 155	539 817	594 579	693 762	738 155	814 121	954 696	1 064 409	1 259 983	1 144 011
	V	1 902 618	1 905 584	1 656 544	2 092 228	2 513 846	1 752 064	1 575 077	1 462 992	1 705 033	1 688 944
Bangladesh	Q	379 087	485 864	574 812	593 202	657 120	712 640	786 604	856 956	914 752	832 091
	V	776 236	969 533	1 061 060	977 235	1 039 102	1 065 284	1 133 067	1 243 121	1 363 180	1 246 479
Japan	Q	829 354	806 534	766 812	759 262	762 824	799 946	828 715	823 873	776 421	746 221
	V	3 894 478	3 522 452	3 061 990	3 365 566	3 317 148	3 369 251	3 374 970	3 367 677	3 205 093	3 178 416
Chile	Q	217 903	272 346	293 044	274 216	391 587	566 096	545 655	563 435	665 421	698 214
	V	787 102	918 652	970 770	908 200	1 249 506	1 725 413	1 641 586	2 137 842	2 744 816	3 08 248
Norway	Q	321 516	367 617	410 757	475 932	491 329	510 748	551 297	584 423	636 802	656 636
	V	997 222	1 053 882	1 144 396	1 339 487	1 384 659	1 019 882	1 164 774	1 352 165	1 681 283	2 072 562
Philippines	Q	349 563	327 147	312 505	352 567	393 863	434 661	443 537	459 615	512 220	557 251
	V	1 205 541	889 350	594 947	678 716	680 728	661 160	632 743	600 836	700 854	793 580
Egypt	Q	91 137	85 704	139 389	226 276	340 093	342 864	376 296	445 181	471 535	539 748
	V	167 902	183 878	327 263	447 146	815 046	756 980	655 565	615 011	613 008	791 846
Myanmar	Q	71 508	82 740	81 968	91 114	98 912	121 266	190 120	252 010	400 360	474 510
	V	744 248	826 258	825 660	805 218	781 368	380 217	576 970	775 331	1 231 230	1 472 320
USA	Q	393 331	438 331	445 123	478 679	456 045	479 254	497 346	544 329	606 549	471 958
	V	736 424	771 181	781 075	833 456	842 798	795 646	714 918	804 533	907 003	849 874
Korea Rep	Q	358 046	392 367	327 462	304 036	293 420	294 484	296 783	387 791	405 748	436 232
	V	678 763	924 520	537 280	586 288	573 006	483 958	546 041	888 657	979 825	1 190 638
China,Taiwan	Q	262 403	257 530	240 435	247 732	243 856	297 428	330 166	351 578	318 273	304 756
	V	1 178 111	945 525	807 401	731 927	836 316	894 674	861 764	906 457	942 789	969 061
France	Q	285 464	287 181	267 790	264 825	266 770	251 620	251 970	239 814	260 655	258 435
	V	600 129	626 881	560 322	487 919	425 053	453 761	501 049	580 422	688 973	690 826
Brazil	Q	77 690	87 674	103 915	140 657	172 450	203 710	242 590	277 640	269 699	257 783
	V	298 379	319 427	381 001	523 877	684 396	750 044	879 225	979 452	965 628	915 567
Spain	Q	231 633	239 136	315 477	321 145	312 171	312 647	259 186	272 778	298 855	221 927
	V	250 131	247 943	307 611	344 357	377 800	392 112	366 870	374 549	406 399	348 887
Italy	Q	184 373	190 719	205 625	207 368	213 525	218 269	183 962	191 662	117 786	180 943
	V	385 217	389 164	438 998	356 389	446 449	415 318	337 135	519 419	365 415	592 524
Malaysia	Q	109 063	107 984	133 635	155 127	151 773	158 158	165 119	167 180	171 270	175 834
	V	183 703	220 842	190 142	224 539	254 150	318 057	318 033	300 021	324 285	339 166
UK	Q	109 901	129 715	137 421	154 800	152 485	170 516	179 036	181 838	207 203	172 813
	V	268 631	426 829	427 874	478 531	461 129	512 713	544 258	517 363	593 300	619 340
Canada	Q	72 376	81 676	91 046	112 916	127 665	153 046	170 746	150 624	145 018	154 083
	V	237 686	238 521	266 910	355 365	391 730	470 022	393 246	350 136	398 907	583 064
Turkey	Q	33 201	45 450	56 700	63 000	79 031	67 244	61 165	79 943	94 010	119 177
	V	182 569	227 960	280 745	306 408	219 775	142 315	130 482	278 614	396 144	514 817
Mexico	Q	31 339	39 500	41 068	48 443	53 918	76 075	73 675	84 475	104 354	117 514
	V	72 843	121 260	159 290	192 016	226 221	352 974	281 927	260 070	329 929	468 573
Iran	Q	29 977	30 279	33 237	31 800	40 550	62 550	76 817	91 714	104 330	117 354
	V	80 033	82 749	92 761	92 405	121 125	194 253	227 109	273 855	316 944	354 503
Russian Fed	Q	52 899	53 171	63 195	68 615	74 124	89 945	101 330	108 684	109 802	114 752
	V	141 159	148 034	167 608	180 322	198 161	234 646	267 251	288 935	301 730	321 350
Greece	Q	39 852	48 838	59 926	84 274	95 418	97 512	87 928	101 434	97 143	106 208
	V	235 864	246 589	274 997	330 428	291 318	307 421	243 891	348 193	369 997	429 824
New Zealand	Q	74 800	76 850	93 807	91 650	85 640	76 024	86 583	84 642	92 219	105 301
	V	45 518	46 425	56 975	57 550	94 628	96 423	108 388	246 837	165 889	204 898
Pakistan	Q	13 557	15 464	17 369	23 076	12 485	57 632	66 970	73 047	76 653	80 622
	V	10 069	10 162	10 440	13 869	9 499	57 632	66 949	73 032	76 653	109 684
Other countries Autres pays Otros países	Q	910 248	951 554	1 007 653	1 044 066	962 346	964 413	1 011 028	1 112 324	1 156 315	1 169 174
	V	2 775 670	2 817 370	2 832 465	2 873 616	2 806 223	2 824 504	3 026 164	3 429 046	3 742 318	3 672 352
<b>World excl. China</b>	<b>Q</b>	<b>8 877 501</b>	<b>9 290 435</b>	<b>9 691 952</b>	<b>10 591 091</b>	<b>10 896 776</b>	<b>11 905 082</b>	<b>12 621 621</b>	<b>13 798 511</b>	<b>15 311 680</b>	<b>15 735 708</b>
<b>Monde excl. Chine</b>	<b>V</b>	<b>23 517 315</b>	<b>23 942 213</b>	<b>22 997 252</b>	<b>25 016 958</b>	<b>26 791 373</b>	<b>26 562 205</b>	<b>26 164 378</b>	<b>29 230 209</b>	<b>33 737 398</b>	<b>36 378 686</b>
<b>Mundo excl. China</b>											

These countries are those with production of 80 000 tonnes or more in 2005. See note on China in NOTES ON INDIVIDUAL COUNTRIES OR AREAS.

Ces pays sont ceux dont la production a été de 80 000 tonnes ou plus en 2005. Voir la note sur la Chine dans les NOTES SUR DIVERS PAYS OU ZONES.

Estos países son referentes a los que totalizan una producción de 80 000 toneladas o más en 2005. Véase la nota sobre China en las NOTAS SOBRE LOS DISTINTOS PAÍSES O ÁREAS.

## 9.2 Anexo 2.<sup>3</sup>

### **Moluscos Bivalves Destinados ao Consumo Humano Como Vetores de Protozoários Patogênicos: Metodologias de Detecção e Normas de Controle.** **Bivalve Molluscs Destined for Human Consumption as Vectors of Pathogenic Protozoa: Detection Methodologies and Control Rules.**

Diego Averaldo Guiguet Leal<sup>a</sup>

Leal, D.A.G

Regina Maura Bueno Franco<sup>b\*</sup>

Franco, R.M.B.

<sup>a</sup> Aluno de Mestrado em Parasitologia. Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Caixa Postal 6109, CEP: 13083-970.

<sup>b</sup> Profa. Dra. em Parasitologia. Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Caixa Postal 6109, CEP: 13083-970.

Parasitology Department, Biology Institute, State University of Campinas, SP, Brazil. PO Box 6109, CEP: 13083-970.

Trabalho realizado no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas.

\*Autor encarregado da correspondência: e-mail: mfranco@unicamp.br Telefone: +55 -19 – 3521-6285.

---

<sup>3</sup> Artigo de revisão aceito para publicação pela Revista Pan Americana de Infectologia.

## ABSTRACT

Marine and coastal areas harbor a large variety of animal species that serve as a food source to all human being. Among all species, the marine bivalve molluscs have been attracting worldwide attention, not only because of their increasing production and consumption on the past decades, but especially because they may act as biological indicators of human and animal faecal pollution in places where they are cultivated or harvested for human consumption. In addition, they are able to filter large volumes of water a day and if human waterborne pathogens like *Cryptosporidium* and *Giardia* are present at the surrounding areas where they inhabit, they may accumulate and concentrate protozoan or other pathogens, especially in their guts, gills and in the haemolymph. Many outbreaks associated to the consumption of bivalve molluscs have been reported worldwide, especially related to the ingestion of raw food, like oysters, but until today, there are no reports of pathogenic protozoa outbreaks linked to the ingestion of bivalve molluscs. However, it is noteworthy that the ingestion of shellfish would pose a threat and a risk to the acquisition of emerging diseases to immunocompromised or immunocompetent population. In Brazil, people are not aware of the risks on the acquisition of parasite infections associated to the ingestion of shellfish, principally those eaten raw. This review elucidates several aspects about the natural occurrence of pathogenic protozoa in shellfish reported in many countries and inclusively in Brazil. Moreover, it emphasizes the principal methodologies and techniques available to this detection, the control rules and current Brazilian legislation for the cultivation, production and consumption of shellfish in our country.

Key words: *Cryptosporidium*, *Giardia*, mariculture, bivalve molluscs, detection, Brazil

## RESUMO:

As áreas costeiras e marinhas albergam uma larga variedade de espécies animais que servem como fonte de alimento para toda a humanidade. Dentre todas estas espécies, os moluscos bivalves marinhos têm atraído a atenção mundial, não somente devido ao crescente aumento de sua produção e consumo nas últimas décadas, mas especialmente porque eles podem atuar como indicadores biológicos de poluição fecal de seres humanos e animais nos locais onde estes são cultivados ou coletados para o consumo humano. Ademais, são capazes de filtrar grandes volumes de água por dia e, se patógenos humanos de veiculação hídrica, como *Cryptosporidium* e *Giardia*, estiverem presentes nos arredores das áreas onde os moluscos vivem, estes ou outros patógenos podem ficar acumulados e concentrados, especialmente no intestino, brânquias ou na hemolinfa dos animais. Muitos surtos associados ao consumo de moluscos bivalves têm sido reportados no mundo todo, especialmente relacionados com a ingestão de alimentos crus, como as ostras, mas, até os dias de hoje, não existem relatos de surtos de protozoários patogênicos associados ao consumo de moluscos bivalves. Entretanto, é notável que a ingestão de mariscos pode representar uma ameaça e um risco de aquisição de doenças emergentes para populações imunocomprometidas ou imunocompetentes. No Brasil, a população não está ciente dos riscos potenciais de aquisição de infecções parasitárias associados à ingestão de bivalves, principalmente aqueles ingeridos crus. Esta revisão elucida diversos aspectos sobre a ocorrência natural de protozoários patogênicos em moluscos bivalves reportada em muitos países do mundo e, inclusive no Brasil. Além disso, enfatiza as principais metodologias e técnicas disponíveis para a sua detecção, as normas de controle e a legislação brasileira vigente para o cultivo, produção e consumo de moluscos bivalves em nosso país.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*, *Giardia*, maricultura, moluscos bivalves, detecção, Brasil.

## 1. Introdução

As áreas costeiras albergam numerosas espécies de animais que representam uma importante fonte de alimentação para a humanidade. O ser humano utiliza a aquicultura para suprir suas necessidades alimentícias há mais de 4.000 anos, sendo o continente Asiático pioneiro e detentor da maior produção mundial, uma vez que oito entre os dez maiores produtores estão localizados neste continente<sup>(1,2)</sup>.

A aquicultura pode ser entendida como o cultivo de animais ou vegetais que necessitam dos ambientes aquáticos para o desenvolvimento de parte ou da totalidade do seu ciclo vital onde se incluem o cultivo de peixes, camarões, ostras, mexilhões, vieiras, rãs, entre outros<sup>(3)</sup>.

Na atualidade, o Brasil ocupa a 17ª posição entre os maiores produtores aquícolas mundiais, com uma produção de quase 258.000 toneladas, segundo dados divulgados recentemente pelo Fundo das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação<sup>(2)</sup>. Esta atividade, além de auxiliar o abastecimento da população nacional, também contribuiu para o crescimento da economia visto que, em apenas uma década, o país triplicou o valor da produção total do ano de 1996, ou seja, o valor líquido da produção passou de aproximadamente 298 para 915 mil dólares<sup>(2)</sup>.

Dentro da aquicultura, a maricultura (produção de moluscos) merece especial destaque considerando que o cultivo de ostras superou a produção de peixes e crustáceos, no período de 1998 a 2005, sendo *Crassostrea gigas* a espécie de ostra mais cultivada em todo o mundo<sup>(4)</sup>. O Brasil possui um enorme potencial para a maricultura, dispondo de um litoral de cerca de 8.000 km<sup>(5)</sup>.

Apesar da crescente emergência da maricultura no país, há dificuldades para consolidação de sua posição como produtor mundial porque existe um déficit no controle higiênico-sanitário destes animais e, das áreas em que são cultivados<sup>(6)</sup>. Adicione-se a esse cenário o fato de que as áreas costeiras estão cada vez mais sujeitas aos impactos antrópicos, como a elevada concentração de esgotos domésticos lançados *in natura* diretamente nos mares ou nos rios, sendo que somente 20% de todo o esgoto produzido no país é coletado e submetido ao tratamento<sup>(7)</sup>.

O despejo de esgoto sem tratamento ou tratado em rios e mares compromete a qualidade destes corpos hídricos, pois podem introduzir patógenos entéricos humanos e contribuir para a elevação dos níveis de nutrientes orgânicos nestas áreas<sup>(8,9)</sup>. Por outro lado, o crescimento populacional aumentou vertiginosamente a quantidade de esgotos lançados nos córregos, rios e no mar, próximos aos centros urbanos assim, a capacidade de autodepuração desses corpos receptores foi superada pela carga poluidora dos efluentes<sup>(10)</sup>.

Os moluscos bivalves habitam ecossistemas aquáticos, sejam eles marinhos ou de água doce, refletindo diretamente as condições do ambiente em que vivem. Devido à contaminação de seu habitat natural, estes organismos atuam como bioindicadores de contaminação fecal provenientes de seres humanos e animais<sup>(11,12)</sup>.

O entendimento da fisiologia destes animais explica porque os seres humanos podem contrair diversas doenças ao ingeri-los crus ou parcialmente cozidos: muitas das espécies de bivalves alimentam-se mediante o processo de filtração, realizado pelas brânquias onde grandes volumes de água passam

através dessas estruturas por ação ciliar<sup>(13)</sup>. Quando microrganismos patogênicos como bactérias, vírus e protozoários estão presentes nos locais de coleta e produção destes animais, são filtrados pelas brânquias e aí ficam retidos, podendo, posteriormente também ser encontrados nas glândulas digestivas, em altas concentrações<sup>(13,14)</sup>.

Outro fator que contribui significativamente para a contaminação do ambiente marinho por patógenos, é a presença de fezes de animais domésticos e de produção que são descartadas ou carreadas pela drenagem hídrica de sedimentos para áreas costeiras e estuários<sup>(9)</sup>.

Embora pesquisas sobre a presença de oocistos e cistos de espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* na água marinha não sejam tão freqüentes, mesmo em nível mundial, ambos os protozoários já foram detectados em praias e regiões estuarinas de alguns países. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* foram encontrados em uma região costeira do Havaí<sup>(15)</sup>, perto de um ponto de despejo de esgoto; foram identificados em um estuário na Austrália<sup>(16)</sup>, em regiões estuarinas da costa da Galícia, na Espanha<sup>(17,18)</sup> e, nos Países Baixos<sup>(19)</sup>, em diferentes concentrações. Em Hong Kong, cistos de *Giardia* foram encontrados em praias liberadas para uso recreacional consideradas próprias para banho<sup>(20)</sup>.

Assim, o local no qual ocorre a produção e o extrativismo de diferentes espécies de moluscos bivalves, destinados ao consumo humano, emerge como um fator fundamental para que estes possam ser comercializados com total segurança e isentos de quaisquer microrganismos patogênicos para o consumidor.

No Brasil, 90% da produção de moluscos bivalves está concentrada na região Sul, no Estado de Santa Catarina<sup>(6)</sup>. Recentemente, a comercialização e consumo de moluscos bivalves, mais precisamente de mexilhões foi suspensa neste Estado, devido à contaminação dos locais em que estes se encontravam por algas nocivas, após a ocorrência de um surto de diarreia que acometeu dezenas de pessoas<sup>(21)</sup>.

Mediante experimentos de contaminação artificial, pesquisadores de Santa Catarina provaram que ostras (*Crassostrea gigas*) foram capazes de acumular o vírus da hepatite A em seus tecidos<sup>(22)</sup>; Sincero et al.<sup>(23)</sup> desenvolveram uma técnica para detectar este mesmo vírus em ostras quando presentes em baixos níveis de contaminação.

Surtos de doenças associadas ao consumo de moluscos bivalves foram reportados no mundo todo, especialmente na América do Norte, Ásia, Europa e no continente Australiano, sendo que nas últimas três décadas houve um constante aumento dos relatos de surtos ocasionados principalmente pela ingestão de ostras, seguida de mariscos e mexilhões<sup>(13)</sup>. O maior surto já noticiado ocorreu em Xangai, na China, no ano de 1988, onde 290.000 pessoas contraíram o vírus da hepatite A após ingerirem mariscos e, 47 pessoas foram a óbito<sup>(24)</sup>.

Em nível global, um aspecto emergente e com fortes implicações em saúde pública consiste na contaminação de moluscos bivalves por protozoários patogênicos. Embora até os dias de hoje não se tenham relatos da ocorrência de surtos de protozooses relacionados à ingestão de mariscos em todo o mundo, a ocorrência natural de *Cryptosporidium* e *Giardia* já foi reportada em diversos países em diferentes espécies de moluscos bivalves (Tabela I). Por este motivo,

conceitos têm sido amplamente discutidos e divulgados em todo o mundo sobre os riscos potenciais da aquisição de protozooses mediante a ingestão de mariscos crus ou mal-cozidos. As infecções por protozoários patogênicos intestinais como *Giardia* e *Cryptosporidium* representam uma ameaça à saúde humana; no caso da giardiose, ocorre uma expressiva falha do desenvolvimento físico e cognitivo em crianças e a infecção por *Cryptosporidium* pode levar a um quadro de desidratação severa em categorias populacionais mais vulneráveis ou mais expostas, como os imunossuprimidos e imunodeficientes, pela ingestão de apenas um oocisto do protozoário<sup>(25)</sup>.

Diante deste cenário, torna-se especialmente relevante e necessário o monitoramento parasitológico das espécies de moluscos bivalves que serão ofertados à população e também das áreas onde os mesmos são encontrados, tanto nas fazendas de maricultura, como nos ambientes naturais disponíveis para a catação exploratória.

## **2. Protozoários Patogênicos: *Cryptosporidium* e *Giardia***

*Cryptosporidium* e *Giardia* são os protozoários parasitas entéricos mais comuns do homem e de animais domésticos e são reconhecidos comumente como parasitos de um amplo espectro de hospedeiros silvestres<sup>(26,27,28)</sup>.

Ambos os protozoários são transmitidos mediante a rota fecal-oral, após os estágios infectantes (oocistos e cistos) serem ingeridos pelos hospedeiros susceptíveis. A transmissão para os seres humanos ocorre por meio do contato direto de hospedeiro para hospedeiro, ou de maneira indireta, via água ou alimentos contaminados, superfícies contaminadas e mecanicamente por

artrópodes e, já se evidenciou a transmissão de oocistos de *Cryptosporidium* pela via aérea<sup>(27,29,30)</sup>.

Esses protozoários apresentam características comuns que influenciam a epidemiologia destas parasitoses: a dose infectante é pequena (de 1 a 10 oocistos e cistos); os cistos e oocistos já são eliminados infectantes nas fezes de seus hospedeiros e são muito resistentes aos desinfetantes comumente empregados para potabilizar a água; são estáveis quando presentes em diferentes ambientes; apresentam elevado potencial para a dispersão ambiental de cistos e oocistos o que pode propiciar a contaminação da água destinada ao consumo humano, os alimentos e as áreas recreacionais e costeiras<sup>(26,31)</sup>.

Hospedeiros infectados, como pessoas imunodeficientes e animais jovens, eliminam em suas fezes cerca de  $10^9$ -  $10^{10}$  oocistos de *Cryptosporidium* durante o curso da infecção, assim como a eliminação de cistos de *Giardia* pode chegar até  $10^7$  por grama de fezes<sup>(9)</sup>.

*Giardia duodenalis* (sinonímia *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis*) é um protozoário intestinal de distribuição cosmopolita. Estima-se que ocorram  $2,8 \times 10^8$  casos por ano em todo o mundo<sup>(32)</sup>. É um protozoário não invasivo, que vive e se multiplica assexuadamente na superfície do lúmen intestinal dos hospedeiros vertebrados, onde a sintomatologia é variada, incluindo diarreia aguda ou crônica, desidratação, dor abdominal e perda de peso<sup>(27,33)</sup> até casos assintomáticos.

A presença do parasito pode ocasionar uma falha no desenvolvimento físico e cognitivo em crianças, pois *Giardia* altera a permeabilidade epitelial aos nutrientes e vitaminas, devido a um efeito citopático direto induzido pelos produtos

do parasito, ocorrendo injúrias na bordadura em escova, e a absorção é comprometida<sup>(34,35)</sup>.

*Giardia duodenalis* é a única espécie com potencial patogênico para o ser humano. Entretanto, com o advento das técnicas moleculares, ficou provado que *Giardia duodenalis* não é uma espécie uniforme e sim um complexo de espécies que exibem variedades genótípicas e fenotípicas distintas, ainda que genótipos similares morfologicamente apresentem diferenciada especificidade de hospedeiros<sup>(27)</sup>. Desta forma, os genótipos foram divididos em vários grupos ou assembléias, sendo que apenas nos grupos A e B encontram-se os subgrupos capazes de infectar o ser humano (Tabela II).

*Cryptosporidium* é um protozoário patogênico descrito pela primeira vez no início do século XX por Tyzzer (1907)<sup>(36)</sup>. É o único protozoário parasita intracelular que apresenta localização extra-citoplasmática, pois parasita a superfície das microvilosidades dos enterócitos intestinais<sup>(26,37)</sup>.

A criptosporidiose emergiu como uma protozoose oportunista paralelamente ao advento da pandemia HIV/AIDS no início da década de 80. Hoje, sabe-se que não somente os portadores do vírus HIV, mas, também outros grupos populacionais podem ser gravemente afetados devido às infecções ocasionadas por diversas espécies de *Cryptosporidium* (Tabela III) que apresentam potencial infectante para o ser humano<sup>(31,38)</sup>.

A criptosporidiose pode afetar com severidade crianças (0 - 5 anos), idosos, desnutridos, diabéticos, pacientes que realizam hemodiálise, quimioterapia, transplantados ou que utilizam medicamentos a base de corticosteróides<sup>(30,31,39)</sup>. Estes indivíduos podem desenvolver um quadro de diarréia aquosa cuja

severidade é proporcional ao grau de alteração imunológica e, muitas vezes, a hospitalização é necessária em função da severa desidratação ocasionada pelo protozoário<sup>(39,40)</sup>.

A descoberta desse protozoário entra em seu primeiro centenário e, ainda existem muitas lacunas e questionamentos para serem elucidados acerca de sua epidemiologia no ambiente, técnicas mais sensíveis de detecção ou uma terapia eficiente capaz de promover a cura parasitológica dos hospedeiros infectados. Até o presente momento, a avaliação de aproximadamente 200 fármacos já foi testada para o tratamento da criptosporidiose e poucos foram eficazes<sup>(41)</sup>. A nitazoxanida foi liberada para uso pediátrico mas, sua eficácia e segurança em adultos saudáveis e indivíduos imunocomprometidos não foram completamente estabelecidas<sup>(42)</sup> e, por esta razão, existe uma grande discussão e preocupação com a sua presença no ambiente, nos alimentos e principalmente em águas destinadas para o consumo humano<sup>(25,31,43)</sup>.

A veiculação hídrica de protozoários patogênicos tornou-se um assunto de extrema relevância em saúde pública, ocorrendo mundialmente e atingindo também os países desenvolvidos, onde há um elevado grau de saneamento básico. Nos Estados Unidos, de 1965 a 2002, ocorreram 148 surtos de giardiose por veiculação hídrica com 30.009 casos confirmados. No período de 1984 a 2002, 69 surtos de criptosporidiose que afetaram 436.232 pessoas foram registrados<sup>(44)</sup>. Foram incriminadas como fontes de aquisição destas protozooses a água destinada para o consumo humano, bem como a ingestão acidental de águas recreacionais<sup>(44)</sup>.

Assim, o entendimento dos mecanismos de controle destes protozoários no ambiente é necessário para que medidas corretivas e profiláticas possam ser tomadas. Para isto, mais estudos são necessários para a compreensão das fontes de contaminação, concentrações, sobrevivência e transporte destes protozoários no ambiente<sup>(25,26)</sup> objetivando minimizar suas rotas de transmissão hídrica e alimentar e garantir o abastecimento seguro da água e de alimentos para toda a população e para as gerações futuras.

### **3. Métodos para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em moluscos bivalves.**

A pesquisa de oocistos e cistos de protozoários patogênicos em tecidos de bivalves é um processo tecnológico altamente complexo<sup>(45)</sup>. Para se chegar à detecção precisa destes agentes parasitários em qualquer tipo de amostra ambiental, são necessários não somente equipamentos e ferramentas adequadas, mas também deve-se contar com recursos humanos devidamente capacitados. Entre as inúmeras competências necessárias, deve-se ressaltar a importância do conhecimento da biologia e morfologia das formas parasitárias pelos indivíduos envolvidos na detecção de protozoários em amostras ambientais.

Em relação às metodologias utilizadas para o processamento dos exemplares de moluscos, a técnica mais difundida mundialmente baseia-se na análise de tecidos específicos, tais como as brânquias, trato gastrointestinal ou a hemolinfa. Grande parte dos pesquisadores trabalha com a análise de brânquias e trato gastrointestinal, a partir de macerados teciduais analisando alíquotas destes e empregando a reação de imunofluorescência direta (RID) com anticorpos

monoclonais para a visualização de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*<sup>(11,17,46,47)</sup>.

Utilizando a RID e técnicas moleculares, oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados nas estruturas branquiais de ostras e mariscos, coletados de 37 pontos em 13 estados da Costa Atlântica dos Estados Unidos (Maine até a Flórida) e também de uma província canadense<sup>(48)</sup>.

Neste estudo, os autores removeram as brânquias dos animais e estas, foram levadas ao vórtex, em solução salina de Hanks. O líquido resultante da lavagem destas estruturas foi posteriormente examinado, verificando-se que em 64,9% dos pontos estudados ao longo da costa Atlântica, os moluscos apresentavam oocistos.

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* também foi reportada em outras regiões da América do Norte e Europa, com o emprego da técnica de análise de homogenados brânquias, intestinais e de lavados branquiais de diferentes espécies de moluscos (*Crassostrea virginica*, *Mytilus galloprovincialis*, *Ruditapes philipinarum*, *Ostrea edulis*, *Venus verrucosa*, *Dosinia exoleta*, *Venerupis pullastra*, *Venerupis rhomboideus*)<sup>(46,49)</sup>.

Cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados nos Países Baixos em homogenados intestinais de ostras (*Crassostrea gigas*) empregando a RID<sup>(19)</sup>.

A hemolinfa está presente em grande quantidade nos músculos adutores dos bivalves (estes músculos são importantes, pois conferem resistência e proteção aos animais)<sup>(50)</sup>. Oocistos também podem ser detectados na hemolinfa. Por exemplo, na Itália, oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em

concentrações de 14 a 30 oocistos/ml do fluído circulatório do molusco<sup>(51)</sup>. Entretanto, de acordo com alguns autores, a hemolinfa não deve ser examinada quando se empregam ensaios de imunofluorescência direta uma vez que os hemócitos presentes neste tecido exibem uma fluorescência própria, dificultando a visualização dos oocistos e gerando resultados falsos positivos<sup>(52)</sup>.

A reação de cadeia de polimerase (PCR) tem sido empregada em pesquisa científica para a confirmação e classificação de espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* em tecidos de mariscos<sup>(53,54,55)</sup>.

Gómez-Couso et al.<sup>(53)</sup> avaliaram a contaminação natural para ambos os protozoários em ostras, mexilhões, vôngoles, vieiras e outros mariscos provenientes da Espanha e do Reino Unido. Do total de 87 moluscos bivalves examinados 24 apresentaram contaminação por *Cryptosporidium parvum* e uma amostra apresentava *Cryptosporidium hominis* assim como também foi detectada positividade para *Giardia duodenalis*, pertencente à assembléia B em uma amostra.

A separação imunomagnética (IMS) é um procedimento de captura das partículas-alvo que vem sendo gradativamente aplicado às amostras ambientais, especialmente quando há um grande número de partículas, microrganismos e sujidades. A IMS é uma etapa de purificação que confere uma maior sensibilidade para a recuperação de cistos e oocistos. A técnica é baseada na adição de microesferas magnetizadas e recobertas com anticorpos anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* à amostra a ser analisada, promovendo a captura e isolamento de cistos e oocistos de partículas interferentes. Esta técnica pode ser usada em combinação com a RID e o PCR<sup>(56)</sup>, porém ela apresenta um custo mais elevado,

cerca de 50 dólares por teste, excetuando-se os custos iniciais de implantação desta metodologia (3.567 dólares).

Comparando-se as técnicas de separação imunomagnética, imunofluorescência direta e PCR para a detecção de cistos e oocistos em tecidos de moluscos bivalves, mesmo presentes em baixos níveis de contaminação, Miller et al.<sup>(52)</sup> constataram que a separação imunomagnética, seguida da reação de imunofluorescência direta foi a técnica mais sensível.

Mais recentemente as técnicas de hibridização *in situ* e PCR foram empregadas para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em tecidos de bivalves<sup>(45)</sup>.

No Brasil e na América Latina o primeiro relato da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em moluscos bivalves destinados ao consumo humano, foi reportado por Leal et al.<sup>(57)</sup> em ostras e vôngoles coletados de seu ambiente natural em uma praia do Litoral Norte de São Paulo. Estes autores encontraram o protozoário em homogenados teciduais dos mariscos, empregando-se a RID, microscopia de contraste de fase e incorporação de corante vital (DAPI) como ferramentas auxiliares na confirmação dos caracteres morfológicos típicos do protozoário.

Contudo, considerando-se a realidade econômica latino-americana, é imprescindível buscar metodologias que apresentem menor custo, mas que sejam reprodutíveis e apresentem boa sensibilidade.

Leal et al.<sup>(58)</sup> padronizaram uma técnica para recuperar oocistos de *Cryptosporidium* a partir de homogenados teciduais de ostras e vôngoles expostos à água do mar, contaminada artificialmente, em um aquário com capacidade de 10

litros. Os moluscos foram mantidos no aquário, sob estas condições durante 24 horas e, após este período de exposição, foram removidos do aquário, abertos e as brânquias e trato-gastrointestinal de 20 animais seccionados e homogeneizados em macerador de tecidos.

Alíquotas dos tecidos foram examinadas por meio da RID para a visualização dos protozoários e, ambas as espécies de moluscos bivalves removeram com eficácia grande parte dos oocistos da água do aquário.

Entretanto, os tecidos dos moluscos contêm muitos lipídeos, (Figura 1) e seu excesso é um fator que interfere diretamente na visualização dos parasitos nos tecidos dos bivalves. Para a remoção de lipídeos alguns autores utilizam a centrifugação com éter-etílico<sup>(11,46)</sup>. Leal et al.<sup>(58)</sup> introduziram uma etapa de lavagem e homogeneização onde o trato gastrointestinal e as brânquias dos bivalves foram macerados com uma solução contendo um surfactante o qual complementa a ação do éter após centrifugação, removendo de forma efetiva uma considerável quantidade de gordura, melhorando a visualização das formas parasitárias durante a RID.

#### ***4. Normas de controle para a criação e comercialização de moluscos bivalves no Brasil.***

No Brasil, a resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) N°. 357 de 17 de Março de 2005<sup>(59)</sup> estabelece padrões para o cultivo de moluscos bivalves destinados a alimentação humana em águas salinas e salobras. Ressalte-se que apenas a pesquisa de indicadores bacteriológicos nas águas em que estes são cultivados é contemplada.

De acordo com esta resolução, a média geométrica de coliformes termotolerantes (de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local) não deverá exceder 43 por 100 mililitros de amostra de água analisada.

Esta legislação aplica-se aos locais de cultivo de ostras e mariscos, como as fazendas de maricultura; entretanto, estas podem não estar livres da contaminação por protozoários patogênicos uma vez que alguns estudos apontaram que o monitoramento de bactérias indicadoras de contaminação fecal não é suficiente para assegurar a qualidade e a segurança quanto à contaminação por protozoários neste tipo de alimento<sup>(11,60)</sup>. Na Holanda, bem como nos Estados Unidos, oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* foram encontrados nas águas em que os animais vivem, porém não foram encontradas correlações entre a presença de indicadores fecais na água e a ocorrência destes protozoários nos animais coletados<sup>(19,45)</sup>.

Diversas espécies de moluscos, cultivados na região da Galícia (Espanha), foram examinados para a presença de protozoários patogênicos e mais de 40% dos animais continham oocistos de *Cryptosporidium* infectantes em seus tecidos; embora a concentração de coliformes fecais (neste caso nos tecidos dos animais) estava de acordo com os padrões exigidos pela legislação do país<sup>(11)</sup>.

A região da Galícia é uma das maiores produtoras de mexilhões do mundo, sendo esta a mais importante área de coleta e produção destes bivalves destinados ao consumo humano na Espanha. Cistos de *Giardia* foram encontrados em 41,8% dos animais analisados provenientes de fazendas de maricultura e o mais alarmante é que a análise da água dos rios que desembocam

nesta área, bem como do esgoto tratado e bruto, revelaram altos níveis de contaminação por cistos<sup>(17)</sup>.

A produção de moluscos no Brasil será rastreada com a implantação do Programa Nacional de Controle Higiênico e Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) coordenado pela Secretária Especial de Aqüicultura e Pesca, visando regular a cadeia de produção de moluscos no país<sup>(6)</sup>, desde a área de colheita até os procedimentos de depuração, processamento, distribuição e comércio incluindo o ponto de venda.

As fazendas de maricultura do país somente têm autorização do Serviço de Inspeção Federal (SIF) para trabalhar com ostras vivas, separadas por tamanho e depuradas. Para isso os animais são colocados em água filtrada e esterilizada por aparelhos ultravioleta para eliminar as impurezas, permanecendo neste processo durante 3 a 8 horas<sup>(6)</sup>. Entretanto, considerando a contaminação por protozoários patogênicos, pesquisas científicas constataram que a depuração, no caso de oocistos de *Cryptosporidium*, foi ineficaz<sup>(11)</sup>.

Pesquisadores espanhóis verificaram que 46.2% dos animais submetidos a depuração por 6 dias (assim como animais submetidos ao processo de depuração por 8 a 14 dias), ainda continham oocistos do protozoário em seus tecidos e, independentemente do tempo de depuração, 50% das amostras contaminadas continham oocistos que mantiveram a sua capacidade infectante inalterada<sup>(11)</sup>. Por outro lado, outros pesquisadores demonstraram que oocistos de *Cryptosporidium* removidos de um aquário e acumulados nos tecidos de mexilhões, eram eliminados no ambiente após 48 horas e apontaram que o tempo de depuração de

72 horas ou mais, seria suficiente para remover totalmente estes estágios parasitários dos moluscos<sup>(61)</sup>.

Entretanto, deve-se ressaltar que os oocistos eliminados no ambiente pelos moluscos, podem ser removidos e acumulados por outros organismos da mesma espécie ou de espécies diferentes, mas co-existentes, o que contribui para a dispersão da contaminação<sup>(62)</sup>.

Oocistos de *Cryptosporidium* experimentalmente presentes em tecidos de mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*), que foram cozidos no vapor, mantiveram sua capacidade infectante inalterada, como comprovado por bioensaio empregando camundongos neonatos<sup>(63)</sup>.

Na cidade de Caraguatatuba, (Litoral Norte do estado de São Paulo) a população autóctone coleta grandes quantidades de vôngoles para a sua subsistência e, dependendo da forma como esse alimento é preparado (se apenas parcialmente cozido ou submetido ao cozimento sob a forma de vapor) oocistos eventualmente presentes podem continuar infectantes para o ser humano, representando um risco potencial à saúde humana.

Sumarizando, é extremamente importante que a pesquisa sobre a ocorrência dos protozoários patogênicos em moluscos destinados à alimentação humana bem como nos locais onde os mesmos são cultivados ou extraídos, seja contemplada e inserida no programa de controle nacional dos moluscos bivalves.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Joseph MM. Mussel and oyster culture in the tropics. Em: De Silva SS, editor. Tropical Mariculture. 1st ed. Academic Press; 1998. p. 309-360.
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Yearbook of Fishery Statistics Summary tables (PDF) 2005; latest summary tables. World aquaculture production of fish, crustaceans, molluscs, etc., by principal producers. Acesso em: 29 de novembro de 2007. Disponível em: [http://www.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=org&xml=FIDI\\_STAT\\_org.xml&xp\\_nav=3,1,3](http://www.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=org&xml=FIDI_STAT_org.xml&xp_nav=3,1,3)
3. Ostrensky A, Borghetti JR. Água e aquicultura. Em: Rebouças AC, Braga B, Tundisi JG, editor. Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação. 3. ed. São Paulo: Escrituras Editora; 2006. p. 579-604.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Yearbook of Fishery Statistics Summary tables (PDF) 2005; latest summary tables. World aquaculture production of fish, crustaceans, molluscs, etc., by principal species. Acesso em: 29 de novembro de 2007. Disponível em: [http://www.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=org&xml=FIDI\\_STAT\\_org.xml&xp\\_nav=3,1,3](http://www.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=org&xml=FIDI_STAT_org.xml&xp_nav=3,1,3)
5. Pereira RC, Soares-Gomes, A. Biologia marinha. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência; 2002.
6. Melo B. Produção de moluscos será rastreada. O Estado de São Paulo, São Paulo, 4. Jul. 2007. Caderno Agrícola. p. 3.
7. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. 2000. Acesso em 21 de Janeiro de 2007. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/esgotamento\\_sanitario/esg\\_sanitario50.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/esgotamento_sanitario/esg_sanitario50.shtm).
8. Lipp EK, Farrah SA, Rose, JB. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. Mar Pol Bull 2001; 42: 286-293.
9. Fayer R, Dubey JP, Lindsay DS. Zoonotic protozoa: from land to sea. Trends Parasitol 2004; 20: 531-536.
10. Philippi Jr A. Saneamento, saúde e ambiente: fundamentos para um desenvolvimento sustentável. 1. ed. Barueri, SP: manole; 2005.
11. Gómez-Couso H, Freire-Santos F, Martínez-Urtaza J, García-Martín O, Ares-Mazás ME. Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. Int J Food Microbiol 2003; 87: 97-105.

12. Miller WA, Atwill ER, Gardner IA, Miller MA, Fritz HM, Hedrick RP, et al. Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. In freshwater ecosystems in California. *Int J Parasitol* 2005; 35: 673-684.
13. Potasman I, Paz A, Odeh M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 921-928.
14. Shumway S. Mussels and public health. Em: Gosling E, editor. The mussels *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Amsterdam, Elsevier; 1992. p. 511-542.
15. Johnson DC, Reynolds KA, Gerba CP, Pepper IL, Rose JB. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. *Wat Sci Tech* 1995; 31: 439-442.
16. Ferguson CM, Coote BG, Ashbolt NJ, Stevenson IM. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Wat Res* 1996; 30: 2045-2054.
17. Gómez-Couso H, Mendez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás E. *Giardia* in shellfish-farming areas: detection in mussels, river water and waste waters. *Vet Parasitol* 2005; 133: 13-18.
18. Gómez-Couso H, Mendez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás E. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. *J Food Prot* 2006; 69:185-190.
19. Schets FM, Van den Berg HH, Engels GB, Lodder WJ, de Roda Husman AM. *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, The Netherlands. *Int J Food Microbiol* 2007; 113: 189-194.
20. Ho BSW, Tam TY. Occurrences of *Giardia* cysts in beach water. *Wat Sci Tech* 1998; 38: 73-76.
21. SC: surto de diarreia suspende consumo de mexilhão. Setembro 2007. Disponível em: <http://noticias.terra.com/brasil/interna/0,,OI1920040-EI715,00.html>. Acesso em 21/09/07.
22. Coelho C, Heinert AP, Simões CMO, Barardi, CRM. Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Food Prot* 2003; 66: 507-511.
23. Sincero TCM, Levin DB, Simões CMO, Barardi CRM. Detection of hepatitis A virus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*). *Wat Res* 40: 895-902, 2006.

24. Tang YW, Wang JX, Xu ZY, Guo YF, Qian WH, Xu JX. A serologically confirmed, case-control study, of a large outbreak of hepatitis A in China, associated with consumption of clam. *Epidemiol Infect* 1991; 107: 651-657.
25. Rose JB, Huffman DE, Gennaccaro A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26: 113-123.
26. Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 2004; 126: 37-56.
27. Thompson RCA. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol* 2004; 126: 15-35.
28. Appelbee AJ, Thompson RCA, Olson ME. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife. The current status and future needs. *Trends Parasitol* 2005; 21: 370-376.
29. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect* 2002; 4: 1047-1058.
30. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection, and identification. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1305-1322.
31. Cacció SM, Thompson RCA, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 2005; 21:430-436.
32. Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol* 2002; 28: 123-147.
33. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 447-475.
34. Buret AG, Mitchell K, Muench DG, Scott KGE. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitol* 2002; 125: 11-19.
35. Scott KGE, Meddings JB, Kirk DR, Lees-Miller SP, Buret AG. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain Kinase-depedent fashion. *Gastroenterol* 2002; 123:1179-1190.
36. Tyzzer EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med Assoc* 1907; 5: 12-13.
37. Sodr e FC, Franco RMB. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. *Rev Brás An Clin* 2001; 33: 97-107.

38. Sunnotel O, Lowery CJ, Moore JE, Dooley JSG, Xiao L, Millar BC, et al. *Cryptosporidium*. Let Appl Microbiol 2006; 43: 7-16.
39. Farthing MJ. Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. Nat Clin Prat Gastroenterol Hepatol 2006; 3: 436-445.
40. Casemore DP, Wright SE, Coop RL. Cryptosporidiosis- Human and animal epidemiology. Em: Fayer R, editor. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press: Boca Raton; 1997. p.65-92.
41. Mead JR. Cryptosporidiosis and the challenges of chemotherapy. Drug Res Updates 2002; 5: 47-57.
42. Ramirez NE, Ward LA, Sreevatsan S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. Microbes Infect 2004; 6: 773-785.
43. Betancourt WQ, Rose JB. Drinking water treatment process for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. Vet Parasitol 2004; 126: 219-234.
44. Oliveira PW. Ocorrência de cistos de *Giardia* spp e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no rio Atibaia, Bacia do rio Piracicaba, Campinas, São Paulo, Brasil. 2005. Tese. Universidade Estadual de Campinas; 2005.
45. Graczyk TK, Lewis EJ, Glass G, Dasilva AJ, Tamang L, Girouard AS, et al. Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake bay. Parasitol Res 2007; 100: 247-253.
46. Freire-Santos F, Oteiza-López AM, Vergara-Castiblanco CA, Ares-Mazás E, Álvarez-Suárez E, García-Martín O. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. J Parasitol 2000; 86: 853-854.
47. Izumi T, Itoh Y, Yagita K, Endo T, Ohyama T. Brackish water benthic shellfish (*Corbicula japonica*) as a biological indicator of *Cryptosporidium parvum* oocysts in River water. Bull Environ Contam Toxicol 2004; 72: 29-37.
48. Fayer R, Trout JM, Lewis EJ, Santin M, Zhou L, Lal AA, et al. Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. Parasitol Res 2003; 89: 141-145.
49. Fayer R, Graczyk TK, Lewis EJ, Trout JM, Farley CA. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake bay. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 1070-1074.
50. Barnes RD, Ruppert EE. Zoologia dos Invertebrados. 6 ed. São Paulo: Roca; 1996.

51. Giangaspero A, Molini U, Iorio R, Traversa D, Paoletti B, Giansante C. *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater clams (*Chamelea gallina*) in Italy. *Prev Vet Med* 2005; 69: 203-212.
52. Miller WA, Gardner LA, Atwill ER, Leutenegger CM, Miller MA, Hedrick RP, et al. Evaluation of methods for improved detection of *Cryptosporidium* spp. In mussels (*Mytilus californianus*). *J Microbiol Met* 2006; 65: 367-379.
53. Gómez-Couso H, Freire-Santos F, Amar CF, Grant KA, Williamson K, Ares Mázas ME, et al. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. *Int J Food Microbiol* 2004; 91: 279-288.
54. Miller WA, Miller MA, Gardner LA, Atwill ER, Harris M, Ames J, et al. New genotypes and factors associated with *Cryptosporidium* detection in mussels (*Mytilus* spp.) along the California coast. *Int J Parasitol* 2005; 35: 1103-1113.
55. Li X, Guyot K, Dei-Cas E, Mallard JP, Ballet JJ, Brasseur P. *Cryptosporidium* oocysts in mussels, (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). *Int J Food Microbiol* 2006; 108: 321-325.
56. Sturbaum GD, Klonicki PT, Marshall MM, Jost BH, Clay BL, Sterling CR. Immunomagnetic separation (IMS)-fluorescent antibody detection and IMS-PCR detection of seeded *Cryptosporidium parvum* in natural waters and their limitations. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 2991-2996.
57. Leal DAG, Pereira MA, Franco RMB, Branco N, Cantusio-Neto R. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil. *J Wat Health*. (No prelo).
58. Leal DAG, Pereira MA, Franco RMB, Branco N. Padronização de uma técnica para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em moluscos bivalves usualmente ingeridos crus. XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, Porto Alegre, Brasil. 2005.
59. Brasil. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. Resolução CONAMA Nº. 357. 17 Mar 2005. Disponível em: [www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf](http://www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf) Acesso em: 23/09/07.
60. Graczyk TK, Schwab KJ. Foodborne infections vectored by molluscan shellfish. *Cur Gastroenterol rep* 2000; 2: 305-309.
61. Gomez-Bautista M, Ortega-Mora LM, Tabares E, Lopez-Rodas V, Costas E. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus*

*galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). Appl Environ Microbiol 2000; 66: 1866-1870.

62. Gómez-Couso H, Freire-Santos F, Ortega-Iñarrea M, Castro-Hermida JA, Ares-Mázas ME. Transmisión de ooguistes de *Cryptosporidium parvum* entre moluscos bivalves de interés comercial. Acta Parasitol Por 2001; 8: 228.

63. Gómez-Couso H, Mendez-Hermida F, Castro-Hermida JA Ares-Mázas E. Cooking mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by steam does not destroy the infectivity of *Cryptosporidium parvum*. J Food Prot 2006; 69: 948-950.

64. Chalmers RM, Sturdee AP, Mellors P, Nicholson V, Lawlor F, Kenny F, et al. *Cryptosporidium parvum* in environmental samples in the Sligo area, Republic of Ireland: a preliminary report. Lett Appl Microbiol 1997; 25: 380-384.

65. Lowery CJ, Nugent P, Moore JE, Millar BC, Xiru X, Dooley JSG. PCR-IMS detection and molecular typing of *Cryptosporidium parvum* recovered from a recreational river source and an associated mussel (*Mytilus edulis*) bed in Northern Ireland. Epidemiol Infect 2001; 127: 545-553.

66. Fayer R, Trout JM, Lewis EJ, Xiao L, Lal A, Jenkins MC et al. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. Parasitol Res 2002; 88: 998-1003.

67. Negm AY. Human pathogenic protozoa in bivalves collected from local markets in Alexandria. J Egyptian Soc Parasitol 2003; 33: 991-998.

Tabela 1: Ocorrência de contaminação natural por protozoários patogênicos em diferentes espécies de moluscos bivalves comestíveis em diversos países do mundo.

Espécie de molusco	Nome popular	Ano do relato	Agente (s) etiológico (s)	País	Ref.
<i>Mytilus edulis</i>	Mexilhão	1997	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Irlanda	(64)
<i>Crassostrea virginica</i>	Ostra	1998	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Estados Unidos	(49)
<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Cerastoderma edule</i>	Mexilhão Vôngole	2000	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Cryptosporidium parvum</i>	Espanha	(61)
<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Venerupis pullastra</i> <i>Venus verrucosa</i> <i>Dosinia exoleta</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Venerupis rhomboideus</i>	Mexilhão Marisco Marisco Marisco Marisco Ostra Marisco	2000	<i>Cryptosporidium</i> spp. (para todos os animais)	Espanha Itália Reino Unido	(46)
<i>Mytilus edulis</i>	Mexilhão	2001	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Irlanda do Norte	(65)
<i>Crassostrea virginica</i>	Ostra	2002	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Cryptosporidium hominis</i> <i>Cryptosporidium baileyi</i>	Estados Unidos	(66)
<i>Caelatura pruneri</i> <i>Donax trunculus limiacus</i>	Marisco Marisco	2003	<i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Cryptosporidium</i> spp.	Egito	(67)
<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Dosinia exoleta</i> <i>Cerastoderma edule</i> <i>Ruditapes decussatus</i> <i>Venerupis pullastra</i>	Mexilhão Marisco Ostra Marisco Vôngole Marisco Marisco	2003	<i>Cryptosporidium</i> spp. (para todos os animais)	Espanha Itália Reino Unido Irlanda Portugal	(11)
<i>Crassostrea virginica</i> (espécies não relatadas)	Ostra Mariscos	2003	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Cryptosporidium hominis</i> <i>C. meleagridis</i>	Estados Unidos	(48)
<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Dosinia exoleta</i> <i>Cerastoderma edule</i> <i>Venerupis pullastra</i> <i>Venerupis rhomboideus</i> <i>Venus verrucosa</i> <i>Perna canaliculus</i>	Mexilhão Marisco Ostra Marisco Vôngole Marisco Marisco Marisco Mexilhão	2004	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Cryptosporidium hominis</i> <i>Giardia duodenalis</i> (Assembléia B)	Espanha Reino Unido Itália Irlanda Nova Zelândia	(53)

<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mexilhão	2005	<i>Giardia</i> spp.	Espanha	(17)
<i>Chamelea gallina</i>	Marisco	2005	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Itália	(51)
<i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Mytilus californianus</i>	Mexilhão Mexilhão	2005	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Cryptosporidium felis</i> <i>C. andersoni</i>	Estados Unidos	(54)
<i>Mytilus edulis</i>	Mexilhão	2006	<i>Cryptosporidium parvum</i>	França	(55)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mexilhão	2006	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Espanha	(18)
<i>Crassostrea gigas</i>	Ostra	2007	<i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Giardia</i> spp.	Holanda Países baixos	(19)
<i>Crassostrea virginica</i>	Ostra	2007	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Estados Unidos	(45)
<i>Crassostrea rhizophorae</i> <i>Tivela mactroides</i>	Ostra Vôngole	2008	<i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Cryptosporidium</i> spp.	Brasil	(57)

---

Tabela 2: Assembléias de *Giardia duodenalis* patogênicas para os seres humanos e de caráter zoonótico.

Assembléia ou Grupo	Subgrupo	Hospedeiros
A	A I (Zoonótico)	Humanos, Gado, Castores, Lêmure Cães, Gatos, Porquinho-da-Índia
A	A II	Humanos
B	B III (Zoonótico)	Humanos; Lêmure; Chinchilas; Castores; Gibão; Ratos; Cães
B	B IV	Humanos

\* Adaptado de Thompson<sup>(27)</sup>.

Tabela 3: Espécies de *Cryptosporidium* com potencial infectante para seres humanos.

Espécies	Hospedeiros susceptíveis	Local de parasitismo
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Humanos; ruminantes	Intestino
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Humanos	Intestino delgado
<i>Cryptosporidium canis</i>	Humanos; canídeos	Intestino delgado
<i>Cryptosporidium felis</i>	Humanos; felídeos	Intestino delgado
<i>Cryptosporidium muris</i>	Humanos; roedores	Estômago
<i>Cryptosporidium suis</i>	Humanos; suínos	Intestino delgado
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Humanos; aves	Intestino

Fonte: Sunnotel et al<sup>(38)</sup>

**9.3 Anexo 3: Correlação entre o número de cistos e oocistos encontrados na água do rio Ipiranga com os fatores físico-químicos, climáticos e microbiológicos.**

<b>Variáveis analisadas</b>		<b>Nº. Oocistos</b>	<b>Nº. Cistos</b>
pH	Pearson	0,070	-0,164
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	<b>0,830*</b>	<b>0,610</b>
	N	12	12
Salinidade	Pearson	-0,141	0,016
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	<b>0,662</b>	<b>0,960</b>
	N	12	12
Temperatura (°C)	Pearson	-0,151	-0,153
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	<b>0,639</b>	<b>0,636</b>
	N	12	12
Coliformes termotolerantes	Pearson	-0,031	-0,198
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	<b>0,924</b>	<b>0,538</b>
	N	12	12
Coliformes totais	Pearson	-0,039	0,022
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	<b>0,904</b>	<b>0,945</b>
	N	12	12
Estreptococos	Pearson	-0,228	-0,073
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	<b>0,527</b>	<b>0,841</b>
	N	10	10
Enterococos	Pearson	-0,243	-0,087
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	<b>0,499</b>	<b>0,811</b>
	N	10	10
<i>E. coli</i>	Pearson	-0,248	0,135
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	<b>0,554</b>	<b>0,750</b>
	N	8	8
Precipitação	Pearson	0,043	0,568
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	<b>0,895</b>	<b>0,054</b>
	N	12	12

\* Valores grafados em amarelo = não significativos ( $p > 0,05$ )

#### 9.4: Anexo 4: Correlação entre o número de cistos e oocistos encontrados na água do mar da praia do Camaroeiro com os fatores físico-químicos, climáticos e microbiológicos

Variáveis analisadas		Nº. oocistos	Nº. cistos
pH	Pearson	-0,256	-0,346
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	0,474**	0,328
	N	10	10
Salinidade	Pearson	0,171	-0,168
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	0,637	0,643
	N	10	10
Temperatura (°C)	Pearson	-0,392	0,181
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	0,262	0,617
	N	10	10
Coliformes termotolerantes	Pearson	-0,234	,790(*)
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	0,516	0,007***
	N	10	10
Coliformes totais	Pearson	-0,156	0,440
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	0,666	0,203
	N	10	10
Streptococos	Pearson	0,000	-0,093
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	1,000	0,826
	N	8	8
Enterococos	Pearson	-0,037	-0,100
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	0,930	0,813
	N	8	8
<i>E. coli</i>	Pearson	-0,247	.(a)
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	0,556	0,000
	N	8	8
Precipitação	Pearson	0,473	-0,099
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)	0,167	0,785
	N	10	10

\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

\*\* Valores grafados em amarelo = não significativos ( $p > 0,05$ )

\*\*\* Valores grafados em vermelho = significativo ( $p < 0,05$ )

## First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil

Diego Averaldo Guiguet Leal, Mirna Aparecida Pereira,  
Regina Maura Bueno Franco, Nilson Branco and Romeu Cantusio Neto

### ABSTRACT

The consumption of oysters and cockles, which are usually eaten raw or lightly-cooked, can cause outbreaks of human diseases, especially if these shellfish are harvested from polluted areas. In Brazil data about the occurrence of pathogens, like hepatitis A virus, in shellfish have been reported but research on natural contamination for pathogenic protozoa is still non-existent. *Cryptosporidium* oocyst contamination of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) was evaluated during two different periods in a coastal area from São Paulo, Brazil. From June to November 2005, and from July to December 2006, 180 mollusks were harvested for tissue examination. The gills and gastrointestinal tract ( $n = 36$  pools) were carefully extracted from the animals and homogenized in a tissue homogenizer by adding surfactant Tween 80 (0.1%). Immunofluorescence assays were performed and *Cryptosporidium* oocysts were detected in 50.0% of gill pools of cockles and 10.0% of gill pools of oysters. In order to evaluate seawater quality in shellfish growing areas, total levels of thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* and enterococci were determined. This is the first time that *Cryptosporidium* oocysts were found in shellfish from the coastal region of Brazil, and to the best of our knowledge it is also the first report in Latin America and the case might be of public health importance, reflecting the extension of the contamination on seafood, requiring a need for quality control standards.

**Key words** | Brazil, cockles, *Cryptosporidium*, detection, oysters, seawater

Diego Averaldo Guiguet Leal  
Mirna Aparecida Pereira  
Regina Maura Bueno Franco (corresponding author)  
Nilson Branco  
Parasitology Department, Biology Institute, State University of Campinas, PO Box 6109, CEP: 13083-970 SP, Brazil  
Tel.: +55-19-35216285  
E-mail: mfranco@unicamp.br

Romeu Cantusio Neto  
Microbiology Laboratory, Society of Water Supply and Sanitation S/A, Campinas, SP, Brazil

### INTRODUCTION

Bivalve mollusks are benthic animals which live in close relationship with marine substratum. These shellfish have the capacity to filter large volumes of water and therefore are able to accumulate, retain and concentrate different pathogens like bacteria, viruses and protozoa (Wittman & Flick 1995; Potasman *et al.* 2002). Therefore, eating raw or improperly cooked shellfish represents a risk to health. The occurrence of protozoan parasites such as *Cryptosporidium* spp. which causes gastroenteritis in a wide range of animal and human hosts, has been reported worldwide in water samples from lakes, rivers, estuaries, ocean and sewage (Fayer 2004; Cantusio Neto *et al.* 2006). In recent times, the

presence of *Cryptosporidium* oocysts was demonstrated in different species of bivalve mollusks following experimental contamination (Graczyk *et al.* 1998; Freire-Santos *et al.* 2001; Gómez-Couso *et al.* 2005).

Mussels, clams, oysters, and cockles from several coastal regions have been confirmed as being naturally contaminated with *Cryptosporidium* oocysts (Fayer *et al.* 1999; Lowery *et al.* 2001; Giangaspero *et al.* 2005; Li *et al.* 2006). Oocysts of *Cryptosporidium* were also found in commercial shellfish from 64.9% of the sites examined along the Atlantic coast, either by microscopy using direct immunofluorescence assay or molecular testing.

(Fayer *et al.* 2003). In Brazil, data about the occurrence of hepatitis A virus in shellfish have been reported in Santa Catarina State (South Region) (Sincero *et al.* 2006) but research of natural contamination for pathogenic protozoa is still non-existent. The detection of these protozoa in shellfish has great relevance, considering that the presence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts has already been reported in beaches of the São Paulo coastal region, according to CETESB- Company of Technology of Environmental Sanitation (2000). Moreover, 12,500 tons of cultured mollusks were produced in 2000, according to data from the Fishing Department (Aquaculture Panorama 2001). In this context, the aim of this study was to evaluate the natural occurrence of *Cryptosporidium* contamination in different molluscan species usually consumed in Brazil and also to verify the microbiological quality of seawater where they live and are harvested for human consumption.

## MATERIALS AND METHODS

### Shellfish sampling site

The “Camaroeiro” beach (23° 37' 49.197” S and 45° 23' 9.1829”), located on the north coast of the state of São Paulo, in Caraguatatuba city, Brazil, (Figure 1), was selected for the present study. This beach presents different sites of domestic sewage discharge along the coast and an estuarine environment at the confluence point of the Ipiranga River and seawater; in addition, it harbors a commercial

harvesting area. A total of 120 oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and 60 cockles (*Tivela mactroides*), between 3 and 6 cm were harvested monthly using hand tongs, during two different periods. From June to November 2005, both species were analyzed; from July to December 2006, only oysters were collected for examination, since there was a significant reduction in the natural population of cockles due to exploratory practices during this period. A specific sampling site was chosen based on its location near a sewage discharge point, where bivalves live. The shellfish were randomly selected, collected and transported under refrigerated conditions for examination at the Protozoology Laboratory, State University of Campinas (UNICAMP), Brazil.

### Oyster and cockle processing

At the laboratory, the shellfish were shucked and the parasitological analysis was conducted as described by Gómez-Couso *et al.* (2003), with modifications. Each sample consisted of the pooled gills and gastrointestinal tracts from ten mollusks and a total of 24 pools of oysters and 12 pools of cockles were examined. The gills and gastrointestinal tract (GI) were excised from each animal and placed in a tissue homogenizer containing Tween 80 (0.1%) and distilled water (2:1). The tissue pools were homogenized and the lipids were extracted by addition of diethyl ether. Then, the tube was vigorously hand agitated for 30 seconds and centrifuged at 1250 x g for 5 minutes in



Figure 1 | Camaroeiro beach and shellfish harvesting site in Caraguatatuba, (SP), Brazil.

PBS (0.04M pH 7.2). The supernatant was aspirated and the pellet was placed in a microcentrifuge tube.

### Detection of *Cryptosporidium* oocysts

A direct immunofluorescence antibody test (IFAT) was used to detect *Cryptosporidium* oocysts in the pellet. For this, samples were vortex mixed, and aliquots of each pellet were pipetted onto slides. The slides were air-dried, fixed with methanol for ten minutes and then stained with a commercially available kit, Merifluor<sup>®</sup> (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio), which uses a specific monoclonal antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) against an epitope of *Cryptosporidium* oocyst wall for protozoan visualization and quantification with epifluorescence microscopy. The criteria used to consider specimens positive for oocysts were based on their size (4–6 µm), shape and their pattern and intensity of immunofluorescence staining (i.e., bright apple green fluorescence of the oocyst wall). Phase-contrast microscopy was used for complete diagnosis and allowed us to confirm the morphology of the parasite, as well as DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole), a nucleic acid stain which fluoresces blue and shows the position and number of nuclei in the oocyst. The number of oocysts detected in each naturally contaminated shellfish was calculated as the total oocyst number detected on the examined aliquots, multiplied by tissue homogenate total volume and divided by the number of shellfish that were being tested.

### Bacterial analysis

Samples of seawater were collected monthly in flasks previously decontaminated, and the most probable number (MPN) procedure was carried out to enumerate thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* and enterococci according to methodology recommended by [Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater \(2005\)](#). In accordance with the federal legislation resolution CONAMA (National Environmental Council) N° 274 (2000), beach water quality can be classified as proper or improper for recreational purposes. The water is categorized as improper if at least one of these indicators is verified: (i) more than 2500 thermotolerant coliforms/100 ml;

(ii) more than 2000 *Escherichia coli*/100 ml; (iii) more than 400 enterococci/100 ml.

## RESULTS AND DISCUSSION

The occurrence of diseases transmitted by shellfish consumption has been increasing worldwide. Many outbreaks associated with bivalve consumption have been reported, especially associated with the ingestion of oysters, followed by clams and mussels ([Potasman \*et al.\* 2002](#)).

Due to the scarcity of data for pathogenic protozoa in seafood on our country, a total of 180 shellfish were analyzed during two different periods of sampling. Oocysts of *Cryptosporidium* were found in both bivalve species analyzed under natural conditions. In the first period they were detected in three of the six gill pools of cockles with a mean concentration of 60 oocysts per cockle. In the second period, oocysts of *Cryptosporidium* were detected in one of twelve gill pools of oysters with an estimated concentration of 12 oocysts per oyster.

The detected oocysts were in conformity with standard fluorescence detection criteria. Phase-contrast microscopy carried out simultaneously at 600x magnification confirmed the characteristic morphology of the parasite and nuclei were visualized with DAPI. *Cryptosporidium* oocysts were not found in any gastrointestinal tract homogenates pools ( $n = 6$  for cockles and 12 for oysters) analyzed during the twelve months of sampling.

The gastrointestinal tract homogenates we analyzed were more difficult to examine than gill homogenates, due to the presence of thick layers on slides, and this may thus explain the complete absence of *Cryptosporidium* oocysts in this tissue. Therefore, oocysts may have gone undetected because of masking. Moreover, [Graczyk \*et al.\* \(1997a,b\)](#) demonstrated the internalization of *Cryptosporidium parvum* oocysts by monolayers of hemocytes in native oysters (*Crassostrea virginica*) and found that there was a loss of fluorescence in the oocyst wall as the time of contact increased, and also pointed out that it disintegrated with time. The oocysts that remained unaltered may be retained principally by the gills, because the pores of the gills and the oocysts are of similar sizes.

Microbiological indicators of seawater were detected in high levels, and the majority of samples were not in

accordance with standard legislation. Thermotolerant coliforms ranged from  $9.0 \times 10^2$  to  $3.3 \times 10^4$ , *Escherichia coli* from  $4.0 \times 10^2$  to  $4.0 \times 10^3$  and enterococci ranged from  $2.0 \times 10^2$  to  $4.0 \times 10^3$  MPN per 100 ml of seawater.

In several months, more than one microbiological indicator was present at higher levels than permitted, as October (2005) when thermotolerant coliforms attained levels of  $3.3 \times 10^4$  and *E. coli*  $4.0 \times 10^3$  MPN per 100 ml. The microbiological data obtained from seawater indicated poorer water quality at the oysters and cockles harvesting site. The elevated level of faecal indicators shows high levels of faecal contamination and may thus explain the number of positive bivalves with *Cryptosporidium* oocysts. However, many other authors have not found a direct and specific correlation between faecal indicator coliforms counts in water with *Cryptosporidium* (Gómez-Couso *et al.* 2003; Gómez-Couso *et al.* 2004; Graczyk *et al.* 2007; Schets *et al.* 2007).

Previous studies have shown the contamination of shellfish by *Cryptosporidium* oocysts in North America (Fayer *et al.* 2003; Miller *et al.* 2005) and in Europe (Gomez-Bautista *et al.* 2000; Li *et al.* 2006; Schets *et al.* 2007). The present survey represents the first report of the occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in two different species of bivalve mollusks in Brazil and in Latin America to date, and indicates the existence of widespread contamination of this waterborne pathogen.

Although this protozoan parasite does not reproduce in bivalve tissues, it can accumulate in high quantity, and oocysts retained in mollusk tissues may remain infectious (Fayer *et al.* 1997; Freire-Santos *et al.* 2001; Graczyk *et al.* 2007). Furthermore, *Cryptosporidium* oocysts can survive in marine waters from several days up to one year, according to experimental data (Tamburrini & Pozio 1999; Freire-Santos *et al.* 2000) and their long-term survival in the environment could increase the hazard of infectious forms being filtered and removed by mollusks, posing a threat if commercialized and consumed.

In Caraguatatuba, São Paulo state, only 32.0% of domestic sewage is collected and treated (SABESP 2006), and in Brazil discharge of effluents is done preferentially into rivers, contaminating and depreciating the value of the water and other environments it flows to (IBGE 2000).

In this study, the number of oocysts found under natural conditions in these bivalve mollusks is sufficient to cause an

infection, if they were viable and found to be species infectious for humans. The mean infectious dose for *Cryptosporidium parvum*, a zoonotic species, is around 10 oocysts (Cooperative Research Centre for Water Quality & Treatment (2005) *Cryptosporidium* genotyping & infectivity analysis 2005). Furthermore, it is thought that the development of an infection through the ingestion of a single oocyst can occur in people with immunological impairments posing a threat to immunocompromised populations (Rose *et al.* 2002).

It is a well-known fact that different species of shellfish act as a biological indicator of animal and human fecal pollution in different environments, where they live or are cultivated (Giangaspero *et al.* 2005; Miller *et al.* 2005); with our findings, however, the *Tivela mactroides* cockle emerges as a new species able to remove waterborne pathogens from contaminated areas very effectively and must be added to this extensive list.

It is noteworthy that in Camaroeiro beach, oyster and cockle fishing is an exploratory practice, where the local population harvests large quantities of animals for their subsistence, without any supervision of federal organizations or competent environmental agencies. Considering that in Brazil the Federal Legislation- resolution CONAMA N° 357 (National Environmental Council 2005) contemplates only the analysis of fecal coliforms in waters where mollusks are cultivated, it is necessary to include monitoring of this protozoan.

## CONCLUSIONS

- The present study leaves no doubt that *Cryptosporidium* is present in oysters and cockles from the north coast of São Paulo State (Brazil). *Cryptosporidium* can be life-threatening, and the ingestion of seafood, particularly oysters, could be involved in the epidemiology of food borne diseases whenever they are consumed in a raw form.
- In developed nations, people with immunological deficiencies are more aware of the risks associated with the consumption of raw foods and are therefore more likely to avoid this type of food. That is not the case for the Brazilian population, at least for poorer individuals. In this context, our report shows valuable information.

- Future works must focus on the detection of this protozoan in beach water, and the correlation of salinity, pH, temperature and precipitation with *Cryptosporidium* at an estuarine area.

## REFERENCES

- Aquaculture Panorama (Panorama da aqüicultura) 2001  
Aquaculture Panorama (Panorama da aqüicultura) Mussels, oysters and scallops (Mexilhões, ostras e vieiras): Um panorama do cultivo no Brasil 2001. *Rev. Pan. Aquic.* **64**, 25–31.
- Cantusio Neto, R., Santos, L. U. & Franco, M. B. 2006 Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. *Wat. Sci. Technol.* **54**(3), 89–94.
- CETESB: Company of Technology of Environmental Sanitation (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 2000 Microbiological indicators and pathogens in marine recreational waters of São Paulo state. In: *Health Related Water Microbiology Symposium. Proceedings of Health Related Water Microbiology Symposium*. International Water Association, 2000 P. B68, Paris.
- Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment 2005 *Cryptosporidium* genotyping and infectivity analysis. Australia. Available at: [www.waterquality.crc.org.au/dwfacts/techfact\\_crypto\\_genoinfect.pdf](http://www.waterquality.crc.org.au/dwfacts/techfact_crypto_genoinfect.pdf). Accessed in March, 2007.
- Fayer, R. 2004 *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* **126**, 37–56.
- Fayer, R., Farley, C. A., Lewis, E. J., Trout, J. M. & Graczyk, T. K. 1997 Potential role of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in the epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2086–2088.
- Fayer, R., Lewis, E. J., Trout, J. M., Graczyk, T. K., Jenkins, M. C., Higgins, J., Xiao, L. & Lal, A. A. 1999 *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 706–710.
- Fayer, R., Trout, J. M., Lewis, E. J., Santin, M., Zhou, L., Lal, A. A. & Xiao, L. 2003 Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. *Parasitol. Res.* **89**, 141–145.
- Freire-Santos, F., Oteiza-López, A. M., Vergara-Castiblanco, C. A. & Ares-Mazás, M. E. 2000 Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques. *Vet. Parasitol.* **89**, 253–259.
- Freire-Santos, F., Oteiza-López, A. M., Castro-Hermida, J. A., García-Martín, O. & Ares-Mazás, M. E. 2001 Viability and infectivity of oocysts recovered from clams *Ruditapes philippinarum*, experimentally contaminated with *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol. Res.* **87**, 428–430.
- Giangaspero, A., Molini, U., Iorio, R., Traversa, D., Paoletti, B. & Giansante, C. 2005 *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater clams (*Chamelea gallina*) in Italy. *Prev. Vet. Med.* **69**, 203–212.
- Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L. M., Tabares, E., López-Rodas, V. & Costas, E. 2000 Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1866–1870.
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Martínez-Urtaza, J., García-Martín, O. & Ares-Mazás, M. E. 2003 Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. *Int. J. Food. Microbiol.* **87**, 97–105.
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Amar, C. F. L., Grant, K. A., Williamson, K., Ares-Mazás, M. E. & McLauchlin, J. 2004 Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. *Int. J. Food. Microbiol.* **91**, 279–288.
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Hernández-Córdova, G. A. & Ares-Mazás, M. E. 2005 A histological study of the transit of *Cryptosporidium parvum* oocysts through clams (*Tapes decussatus*). *Int. J. Food. Microbiol.* **102**, 57–62.
- Graczyk, T. K., Fayer, R., Cranfield, M. R. & Conn, D. B. 1997a *In vitro* interactions of Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*) hemocytes and *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2910–2912.
- Graczyk, T. K., Fayer, R., Lewis, E. J., Farley, C. A. & Trout, J. M. 1997b *In vitro* interactions between hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) Gmelin, 1791 and *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Parasitol.* **83**, 949–952.
- Graczyk, T. K., Fayer, R., Cranfield, M. R. & Conn, D. B. 1998 Recovery of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts by freshwater benthic clams (*Corbicula fluminea*). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(2), 427–430.
- Graczyk, T. K., Lewis, E. J., Glass, G., Dasilva, A. J., Tamang, L., Girouard, A. S. & Curriero, F. C. 2007 Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Parasitol. Res.* **100**, 247–253.
- IBGE Brazilian Institute for Geography and Statistics (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) 2000 National Research of Basic Sanitation. Available at: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pnsb>. Accessed in January 2007.
- Li, X., Guyot, K., Dei-Cas, E., Mallard, J. P., Ballet, J. J. & Brasseur, P. 2006 *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). *Int. J. Food. Microbiol.* **108**, 321–325.
- Lowery, C. J., Nugent, P., Moore, J. E., Millar, B. C., Xiru, X. & Dooley, J. S. 2001 PCR-IMS detection and molecular typing of *Cryptosporidium parvum* from a recreational river source and an associated mussel (*Mytilus edulis*) bed in Northern Ireland. *Epidemiol. Infect.* **127**, 545–553.
- Miller, W. A., Atwill, E. R., Gardner, I. A., Miller, M. A., Fritz, H. M., Hedrick, R. P., Melli, A. C., Barnes, N. M. & Conrad, P. A. 2005 Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal

- contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. *Int. J. Parasitol.* **35**, 673–684.
- National Environmental Council 2000 (Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente) (CONAMA) 2000. Resolution N°. 274. 29/11/2000. Available at: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27400.html> Accessed in March, 2007.
- National Environmental Council 2005 (Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente) (CONAMA) 2005 Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Resolution N°. 357. 17/03/2005. Available at: <http://www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf>. Accessed in February, 2007.
- Potasman, I., Paz, A. & Odeh, M. 2002 Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 921–928.
- Rose, J. B., Huffman, D. E. & Gennaccaro, A. 2002 Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS. Microbiol. Rev.* **2**, 113–123.
- SABESP Basic Sanitation Company of São Paulo State (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo) 2006 In: Plano diretor da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo; Período de 2007-2011.
- Schets, F. M., Harold, H. J. M., Berg, V. D., Engels, G. B., Lodder, W. J. & Husman, A. M. R. 2007 *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, the Netherlands. *Int. J. Food. Microbiol.* **113**, 189–194.
- Sincero, T. C. M., Levin, D. B., Simões, C. M. O. & Barardi, C. R. M. 2006 Detection of hepatitis A virus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*). *Wat. Res.* **40**(5), 895–902.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 2005 21st edition. American Public Health Association, Washington DC.
- Tamburrini, A. & Pozio, E. 1999 Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.* **29**, 711–715.
- Wittman, R. J. & Flick, G. J. 1995 Microbial contamination of shellfish: prevalence, risk to human health, and control strategies. *Annu. Rev. Public. Health.* **16**, 123–140.