

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE
PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

TATIANA SILVEIRA FEIJÓ CARDOZO

DETERMINAÇÃO DO GRAU DE POLUIÇÃO EM *Perna perna* (BIVALVIA) DE BANCOS NATURAIS POR DEJETOS NA PONTA DO TINGUÍ, MANGARATIBA, RIO DE JANEIRO

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

NITERÓI/RJ
2011

TATIANA SILVEIRA FEIJÓ CARDOZO

**DETERMINAÇÃO DO GRAU DE POLUIÇÃO EM *Perna perna*
(BIVALVIA) DE BANCOS NATURAIS POR DEJETOS NA PONTA
DO TINGUÍ, MANGARATIBA, RIO DE JANEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. ELIANA DE FÁTIMA MARQUES DE MESQUITA (UFF)

Co-Orientador: Prof. Dr. CARLOS WILSON GOMES LOPES (UFRRJ)

Niterói
2011

C268

Cardozo, Tatiana Silveira Feijó

Determinação do grau de poluição em Perna perna (Bivalvia) de bancos naturais por dejetos na ponta do Tingui, Mangaratiba, Rio de Janeiro / Tatiana Silveira Feijó Cardozo; orientadora Eliana de Fátima Marques de Mesquita. – 2011.
70f.

Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal)–Universidade Federal Fluminense, 2011.

Orientadora: Eliana de Fátima Marques de Mesquita

1. Parasito. 2. Cryptosporidium. 3. Análise do mexilhão. 4. Poluição ambiental. 5. Coeficiente de Spearman. 6. Baía de Sepetiba (RJ) I. Título.

CDD 591.5249

TATIANA SILVEIRA FEIJÓ CARDOZO

**DETERMINAÇÃO DO GRAU DE POLUIÇÃO EM *Perna perna*
(BIVALVIA) DE BANCOS NATURAIS POR DEJETOS NA PONTA
DO TINGUÍ, MANGARATIBA, RIO DE JANEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 31 de Agosto de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. ELIANA DE FÁTIMA MARQUES DE MESQUITA
FACULDADE DE VETERINÁRIA - UFF

Prof. Dr. CARLOS WILSON GOMES LOPES
INSTITUTO DE VETERINÁRIA – UFRRJ

Prof. Dr. ZANDER BARRETO MIRANDA
FACULDADE DE VETERINÁRIA - UFF

Prof^a Dr^a SÔNIA BARBOSA DOS SANTOS
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES - UERJ

Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO
FACULDADE DE VETERINÁRIA - UFF

Prof. Dr. WALTER FLAUSINO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA - UFRRJ

Niterói
2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **DEUS**, pela permissão de ter chegado onde cheguei até o momento.

Ao meu marido **SERGIAN VIANNA CARDOZO** pela sua dedicação e apoio incansáveis, pela sua amizade incondicional, pela força e pela confiança que me incute; um agradecimento ao marido, ao amigo, ao companheiro; um agradecimento que não cabe nas palavras e que é para viver no dia-a-dia.

A meu filho **JOÃO FEIJÓ CARDOZO** que ainda na barriga já me ensinou o real significado da palavra amor.

Aos meus pais, **LUIZ ALBERTO LOPES FEIJÓ** e **TÂNIA MARA SILVEIRA FEIJÓ** e meus irmãos, **MARCELO SILVEIRA FEIJÓ** e **GUSTAVO SILVEIRA FEIJÓ**, e a toda a minha família, que me deram todo o apoio, incentivo e sabedoria para que eu pudesse concretizar mais esta etapa.

À Professora Dr^a. **ELIANA DE FÁTIMA MARQUES DE MESQUITA** pelo apoio, amizade, confiança e acima de tudo competência pela qual direcionou meus passos nesta longa caminhada e que pretendo continuar compartilhando desses conhecimentos numa trajetória ainda maior.

Ao Professor Dr. **CARLOS WILSON GOMES LOPES**, pelo qual possuo profunda admiração. Sempre me apoiando com extrema competência, dando o norte da pesquisa na qual originou esta Tese. Tenho muito orgulho de ter sido orientado por uma pessoa de tamanho caráter e personalidade fazendo da minha passagem pelo Laboratório de Coccídios e Coccidioses um aprendizado não somente acadêmico, mais de vida.

Àos meus tios maternos, **PAULO CÉSAR GUANABARA DA SILVEIRA** e **FERNANDO OTÁVIO GUANABARA DA SILVEIRA** que não mediram esforços em nos ajudar com a coleta dos dados em dias bons e ruins, em marés altas e baixas.

Aos colegas de Laboratório, **Drs. WALTER LEIRA TEIXEIRA FILHO, WALTER FLAUSINO, BRUNO PEREIRA BERTO,** e aos discentes **GISELE DA SILVA MEIRELES, LANDREANE RAMIREZ GONÇALVES, JANAÍNA DA SOLEDAD RODRIGUES, FLÁVIA ALINE ANDRADE CALIXTO** e todos que estiveram presentes em minha vida nestes últimos quatro anos, auxiliando-me na execução deste trabalho.

Aos amigos de todas as horas, **MIRNA ALBUQUERQUE RIBEIRO ALVES, FLÁVIA CONDE LAVINAS, PATRÍCIA DE CARVALHO PADILHA, RICARDO LAINO RIBEIRO, SILVIA ELIZA PEREIRA, CAMILA FAVARETTO, JOSIANE ROBERTO DOMINGUES** pelo total e incondicional apoio e incentivo a toda minha carreira acadêmica e qualificação profissional.

A minha amiga de infância, pela qual cultivo muito afeto, **SILVIA CRISTINA PRECIOSO DOS SANTOS.**

À todos os Professores Doutores que colaboraram direta e indiretamente para a minha formação profissional, em especial **GILSON TELES BOAVENTURA** e **SHIZUKO KASHIMA.**

À **UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE,** que me acolheu nestes últimos quatro anos e que me proporcionaram momentos de muita aprendizagem, abrindo portas para eu conhecer novas pessoas e fazer novas amizades.

À **UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO,** a que tenho profundo orgulho em citar como meu segundo lar, estendendo e acrescentando valores de vida fundamentais, que me ajudarão a seguir um caminho seguro de realizações, consolidando os meus ideais, e principalmente, capacitando-me para, com certeza alcançá-los.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, f.7

LISTA DE TABELA, f.8

RESUMO, f.9

ABSTRACT, f.11

1 INTRODUÇÃO, f.13

2 REVISÃO DE LITERATURA, f.15

2.1 BAÍA DE SEPETIBA, f.15

2.2 MEXILHÃO, f.17

2.3 GÊNERO *Cryptosporidium*, f.20

2.3.1 Histórico, f.20

2.3.2 Classificação, f.22

2.3.3 Ciclo biológico, f.23

2.3.4 Diagnóstico laboratorial, f.24

2.3.5 Patogenia, f.27

2.3.6 Especificidade aos hospedeiros vertebrados e contaminação cruzada, f.27

2.3.7 Epidemiologia, f.29

2.3.8 Gênero *cryptosporidium* como protozoário de veiculação hídrica, f.31

3 DESENVOLVIMENTO, f.34

3.1 CORRELAÇÃO ENTRE DADOS PARASITOLÓGICOS E BIOMÉTRICOS DE MOLUSCOS BIVALVES COLETADOS NA PONTA DO TINGUÍ, MANGARATIBA, RJ, f.34

3.2 UTILIZAÇÃO DO *Cryptosporidium* COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM MOLUSCOS BIVALVES COLETADOS NA PONTA DO TINGUÍ, MANGARATIBA, RJ, f.46

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, f.58

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, f.60

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1: Baía de Sepetiba, RJ, com a indicação das estações de coleta. Zona interna: 1 – Laje das Enxadas, 2 – Ilha do Socó, 3 – Ilha Bonita. Zona externa: 4 – Costa do Guandu, 5 – Canal da Restinga, 6 – Meio da Baía, 7 – Fundo da Baía e 8 – Ponta do Tinguí (adaptado de Araújo et al, 1998), f.15

1º ARTIGO

FIGURA 1. Correlação entre o número de oocistos por grama de biomassa e o peso da biomassa (em gramas) dos mexilhões (*Perna perna*), f.42

2º ARTIGO

FIGURA 1. Oocisto de *Cryptosporidium* obtido da biomassa de mexilhões (*Perna perna*). Safranina-azul de Metileno, f.61

FIGURA 2. Histogramas de diâmetro maior (a), menor (b) e índice morfométrico (c) dos oocistos de *Cryptosporidium* recuperados da biomassa de mexilhões (*Perna perna*), na Ponta do Tinguí, Mangaratiba, RJ. Eixo Y: frequências; Eixo X: classes de medidas, f.

FIGURA 3. Regressão linear das medidas dos oocistos de *Cryptosporidium* recuperados da biomassa de mexilhões (*Perna perna*), na Ponta do Tinguí, Mangaratiba, RJ, f.

LISTA DE TABELAS

1º ARTIGO

TABELA 1. Correlação do número de oocistos de *Cryptosporidium* por grama de Biomassa (em gramas) dos mexilhões *Perna perna* com os parâmetros de biometria dos mexilhões.

RESUMO

O despejo de esgoto sem tratamento ou tratado em rios e mares compromete a qualidade destes corpos hídricos, pois pode introduzir patógenos entéricos humanos ou animais e contribuir para a elevação dos níveis de nutrientes orgânicos nestas áreas. O objetivo do presente trabalho foi correlacionar os dados biométricos e parasitológicos obtidos de moluscos bivalves coletados na Ponta do Tinguí, Mangaratiba, RJ além de utilizar os oocistos do gênero *Cryptosporidium* como biomarcador de contaminação ambiental em moluscos bivalves coletados na mesma região. Um total de 100 mexilhões foi encaminhado ao laboratório para, inicialmente, serem submetidos à avaliação dos parâmetros biométricos, através da mensuração das valvas quanto à espessura, largura e comprimento, e verificação do peso total e de biomassa. Em seguida foram realizadas as análises parasitológicas através das técnicas de concentração e coloração, para observar a presença de oocistos de *Cryptosporidium*. Para determinação de *Cryptosporidium* como biomarcador de contaminação ambiental foi realizada a retirada das conchas e em seguida a maceração manual dos mexilhões em grau com o auxílio de um pistilo. O macerado foi diluído em água destilada e filtrado obtendo-se uma solução água-biomassa que foi processada de acordo com a técnica de centrífugo-sedimentação formaldeído-éter. Uma alíquota do sedimento de cada amostra foi colocada entre lâmina e lamínula para posterior avaliação em microscopia de campo brilhante, sendo as amostras positivas submetidas à técnica de coloração de safranina-azul de metileno, com o intuito de confrontar o diagnóstico. Em todas as amostras da biomassa dos mexilhões processadas e submetidas à avaliação parasitológica foi observado a presença de oocistos de *Cryptosporidium*. Quando correlacionado, através do coeficiente de Spearman, os dados biométricos e parasitológicos foram observados uma correlação negativa entre os dados analisados, especialmente, quando confrontado o peso total e da biomassa com a quantidade média de oocistos de *Cryptosporidium*, caracterizando uma relação inversamente proporcional entre o peso total e de biomassa encontrado, e o número de oocistos presentes nessa biomassa. A correlação negativa entre os dados biométricos e parasitológicos demonstra que a contaminação ambiental presente na área estudada, esta diretamente relacionada com a taxa de crescimento dos mexilhões, uma vez que estes animais se alimentam por filtração, sendo esta realizada sem nenhuma capacidade seletiva. Em relação aos parâmetros de diâmetro maior, menor e índice

morfométrico, um total de 100 oocistos de *Cryptosporidium* foi mensurado e identificado. As medidas dos oocistos avaliados foram uniformes em sua distribuição. Porém, apesar desta regularidade, a similaridade da morfometria dos oocistos entre as diferentes espécies do gênero *Cryptosporidium* impede a conclusão de que apenas uma única espécie estivesse presente nos oocistos mensurados. Contudo, fica caracterizada através da presença de oocistos de *Cryptosporidium* na biomassa dos mexilhões, a contaminação ambiental, seja por dejetos humanos ou animais, da área estudada.

PALAVRAS-CHAVE. *Cryptosporidium*. Morfometria. Mexilhões. Contaminação ambiental. Coeficiente de Spearman. Baía de Sepetiba.

ABSTRACT

The dumping of untreated or treated sewage into rivers and seas affect the quality of these water bodies, it can introduce enteric pathogens humans or animals and contribute to increased levels of organic nutrients in these areas. The objective of this study was to correlate the biometric data obtained from parasitological and shellfish collected in Ponta Tinguí, Mangaratiba, RJ addition to using the *Cryptosporidium* genus as a biomarker of environmental contamination in shellfish collected in the same region. A total of 100 mussels were sent to the laboratory to initially be submitted to the evaluation of biometric parameters by measuring the valves on the thickness, width and length, and verification of the total weight or biomass. Then parasitological tests were performed through the techniques of concentration and staining, to observe the presence of *Cryptosporidium*. For determination of *Cryptosporidium* as a biomarker of environmental contamination was performed shelling and then manually mussels soaking. The macerate was diluted in distilled water and filtered resulting in a biomass-water solution that has been processed according to the technique of centrifugal formaldehyde-ether sedimentation. An aliquot of each sediment sample was placed between slide and coverslip for further evaluation in bright field microscopy, and positive samples submitted to staining of safranin-methylene blue in order to confront the diagnosis. In all samples of the biomass of mussels processed and submitted to parasitological assessment noted the presence of *Cryptosporidium*. When correlated by the Spearman correlation coefficient, biometric data and parasitological observed a negative correlation between the data analyzed, especially when confronted with the total weight of biomass and the average number of *Cryptosporidium*, featuring an inversely proportional relationship between the total weight and biomass found, and the number of oocysts present in this biomass. The negative correlation between parasitological and biometric data shows that the environmental contamination present in the study area is directly related to the growth rate of mussels as they filter-feeding animals, which is performed without any selective capacity. In relation to the parameters of larger diameter, smaller and shape index, a total of 100 *Cryptosporidium* was measured and identified. The measurements of the oocysts were evaluated uniform distribution. However, despite this regularity, the similarity of the morphology of oocysts between the different species of the genus *Cryptosporidium* prevents the conclusion that only a single species was present in oocysts measured. However, it is characterized by

the presence of *Cryptosporidium* in the biomass of mussels, environmental contamination, whether by human or animal waste, the study area.

KEY WORDS. *Cryptosporidium*. Morphometry. Mussel. Environmental contamination. Spearman coefficient, Sepetiba's bay.

1 INTRODUÇÃO

A degradação dos ambientes naturais é originária das atividades humanas em diferentes vertentes. Além da contaminação do solo, diminuição da cobertura vegetal e perda da biodiversidade relacionada à alteração de ecossistemas, a contaminação de cursos d'água por poluentes de diversas naturezas também se inclui como uma das mais preocupantes formas de agressão ao meio ambiente. Dentre os poluentes, podem-se destacar aqueles oriundos de dejetos humanos e de animais ocasionados pela falta de saneamento básico ou mesmo de infra-estrutura junto às grandes criações de animais. A matéria orgânica gerada por eles, quando não tratadas, podem ser carregadas, para córregos vizinhos, muitos deles transformados em valas negras, que por sua vez, são despejados em grandes rios por seus tributários. Desta maneira estes resíduos não tratados chegam das áreas estuarinas aos manguezais.

Dentro destes manguezais existe toda uma fauna e flora adaptadas a este tipo de ecossistema onde, moluscos bivalves caracterizados como filtradores são capazes de reter minúsculas partículas oriundas dos dejetos eliminados previamente por humanos e/ou animais. Essa contaminação pode comprometer toda a viabilidade do desenvolvimento da aquicultura ou contaminar o consumidor final dos crustáceos e moluscos, interferindo assim, diretamente com a saúde da população que utiliza estes animais em sua alimentação.

A expectativa de crescimento desta atividade, como fonte de alimento, torna evidente a necessidade e importância do controle da qualidade das águas destinadas à criação de moluscos bivalves, bem como o controle sanitário desses organismos

visando garantir a qualidade deste produto no mercado (RODRIGUES, 1998). Sobretudo, considerando a crescente preocupação dos consumidores quanto à sanidade dos produtos alimentícios e o fato dos produtos pesqueiros, de maneira geral, serem altamente perecíveis e susceptíveis a contaminação proveniente do meio no qual estão inseridos.

Avaliações da qualidade sanitária de águas e mariscos têm sido realizadas através de programas de monitoramento de microrganismos indicadores (bioindicadores microbiológicos), que avaliam as respostas da exposição destes aos contaminantes (MELANCON, 1995). Desta forma, os indicadores da qualidade ambiental têm sido utilizados para detectar a existência ou ausência de organismos patogênicos tanto no ambiente como nos produtos dele provenientes (REGAN; MARGOLIN; WATKINS, 1993; BARARDI; SANTOS; SIMÕES, 2001; MUJICA et al., 2003).

Dentre os marcadores de contaminação do produto, alguns protozoários são indicadores específicos e apresentam elevada correlação positiva com a contaminação fecal por animais de sangue quente e, a alimentação por filtração realizada pelos mexilhões, concentra os microorganismos presentes no ambiente marinho (PÁDUA, 2003). O objetivo desse trabalho foi identificar marcadores de contaminação biológica em moluscos bivalves nos manguezais das áreas costeiras da baía de Sepetiba, Rio de Janeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BAÍA DE SEPETIBA

A Baía de Sepetiba é considerada um dos mais importantes ecossistemas aquáticos do estado do Rio de Janeiro, por constituir área de criação de peixes e crustáceos de importância econômica local (COSTA, 1992). Sua forma é alongada, limitando-se a Norte e a Leste pelo continente, ao Sul pela Restinga de Marambaia e a Oeste pela Baía de Ilha Grande (Fig. 1). Seu maior comprimento é de 43 Km no sentido Leste-Oeste e sua maior largura é de 17 km no sentido Norte-Sul, com profundidade máxima de 30 m próxima à Ilha de Itacuruçá, sendo que 40% de sua área apresenta profundidade média de 5 m (COELHO; CARVALHO, 1973).

Embora não tenha atingido um grau de degradação comparativo a outras baías, como a baía de Guanabara, a de Sepetiba é atualmente um centro de desenvolvimento de atividades industriais. Nela os aportes de rejeitos industriais são mais expressivos do que os de resíduos domésticos, que ainda assim, atualmente são consideráveis e estão sendo avolumados (WASSERMAN, 2005).



Figura 1- Baía de Sepetiba, RJ, com a indicação das estações de coleta. Zona interna: 1 – Laje das Enxadas, 2 – Ilha do Socó, 3 – Ilha Bonita. Zona externa: 4 – Costa do Guandu, 5 – Canal da Restinga, 6 – Meio da Baía, 7 – Fundo da Baía e 8 – Ponta do Tinguí (adaptado de ARAÚJO et al., 1998).

As bacias de drenagem que afluem à baía de Sepetiba possuem uma superfície de 2617 km² e contam com uma população que abrange integralmente os municípios de Itaguaí, Mangaratiba, Queimados, Japerí e Miguel Pereira. Inclui-se ainda nas bacias de drenagem desta baía as populações de parte dos municípios do Rio de Janeiro, Nova Iguaçu, Rio Claro, Piraí, Engenheiro Paulo de Frontim e Vassouras). As áreas urbanas cobrem aproximadamente 9% da superfície total das bacias e 19,7% da superfície é constituído por áreas protegidas, incluindo manguezais.

Segundo Oliveira (2009), o aumento da participação da aquicultura na produção de pescado em nível mundial, em grande parte, é devido à estagnação da pesca extrativista. Ao longo das últimas quatro décadas, as estatísticas mostram uma acentuada redução da atividade pesqueira proveniente da pesca extrativista e a ascensão da aquicultura, que evidencia seu potencial para atender aos desafios da segurança alimentar, ou seja, poderá dispor da metade do pescado consumido pela população humana mundial, da geração de empregos e renda, principalmente em países em desenvolvimento. No ano de 2006, este segmento do setor pesqueiro foi responsável por 47% do pescado consumido no mundo gerando um consumo *per capita* de 7,8 kg.

No cenário brasileiro a aquicultura também se encontra em plena ascensão, sendo o segmento da malacocultura (cultivo de moluscos) a segunda atividade mais expressiva da maricultura brasileira destacando-se na economia do país. O estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional de moluscos bivalves detendo 93% da produção no país. Já o estado do Rio de Janeiro a atividade vem se destacando através do cultivo de moluscos bivalves (mexilhões, ostras e vieiras), principalmente em função da potencialidade do litoral fluminense para o seu desenvolvimento (áreas abrigadas, temperaturas amenas), do baixo custo de produção inicial, da padronização e fornecimento constante do produto e rentabilidade. Na baía de Sepetiba, a produção de bivalvos compreende o cultivo de mexilhões da espécie *Perna perna* (Linnaeus, 1758) e de vieiras *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758). A produção média anual ainda é modesta, mas a atividade é de importante cunho social e econômico para a região porque é geradora de alimento e empregos, atuando na complementação da renda de pescadores artesanais contribuindo para a fixação das populações tradicionais em seus locais de origem (OLIVEIRA, 2009).

2.2 MEXILHÃO

O Filo *Mollusca* é o segundo maior filo animal com mais de 100.000 espécies vivas e é um importante filo na linha evolutiva dos invertebrados protostômios, compreendendo de oitenta a cem mil espécies, que ocupam todos os *habitat* conhecidos, é o maior grupo de animais, depois dos insetos (MAGALHÃES, 1985). Aristóteles já realizava estudos sobre esse filo na antigüidade (STIX; STIX; ABBOTT, 1984), porém foi no século XIX que realmente foram impulsionados, recebendo então o nome de malacologia (ABBOTT, 1993). No mar, os moluscos são encontrados desde a zona de marés até profundidades de oito mil metros. São animais que vivem, normalmente, apoiados a um substrato (BOFFI, 1979).

Os moluscos (do latim *molluscus*, mole) são invertebrados, com um corpo não segmentado, de simetria bilateral e que essencialmente está composto por quatro

regiões: cabeça, pé, saco visceral e manto. Os moluscos da classe bivalvia vivem exclusivamente na água, possuem concha formada por duas valvas unidas dorsalmente por um ligamento, geralmente são de sexos separados, raramente ocorrendo hermafroditismo, sua fecundação ocorre livremente na água, (LUNETTA, 1969). Em todo o mundo existem classificadas mais de 20.000 espécies de moluscos bivalves (GOTTING, 1974; LINDNER, 1989).

Segundo Henriques (2004) o termo mexilhão é comumente utilizado na denominação de diversas espécies de bivalves pertencentes à família Mytilidae, sendo mais aplicado àquelas que, pelo seu sabor e conteúdo de carne, são empregadas em larga escala na alimentação humana, representando fonte de proteína animal de baixo custo e de alto valor nutricional (CARMO; COSTA & SIQUEIRA, 1984). Têm sido utilizados pelo homem como alimento desde a antiguidade sendo considerados por algumas culturas, como os gregos e romanos, um alimento nobre, uma verdadeira iguaria, que somente era servido em ocasiões muito importantes (FERREIRA; MAGALHÃES 2003).

No Brasil, os mitilídeos de interesse econômico são: *Mytilus edulis platensis*, espécie tipicamente oceânica que habita o litoral do Rio Grande do Sul; *Mytella guyanensis* e *M. falcata*, espécies de águas estuarinas, que se distribuem desde o Amapá até Santa Catarina é *P. perna*. No litoral do Estado de São Paulo os mitilídeos mais abundantes são: *Perna perna* que ocorre nos costões rochosos em águas oceânicas e *M. falcata* e *M. guyanensis*, nos estuários (HENRIQUES, 2004).

A espécie *P. perna*, não possui *sinus* palial nem o músculo adutor posterior. As valvas apresentam linhas de crescimento bem definidas. Sua distribuição geográfica vai desde a Venezuela até o Uruguai, sendo muito abundante entre o Rio de Janeiro e Santa Catarina (KLAPPENBACH, 1965). Sua forma fixação se dá através do bisso a substratos duros da zona intertidal, tanto em locais com forte arrebentação como em pontos mais abrigados, sendo, porém são bastante abundantes em costões rochosos expostos à ação das ondas. Como vivem principalmente na região de entre marés, estão adaptados a permanecer por longos períodos expostos ao ar e ao sol.

Quando os mexilhões estão reunidos em colônias fixadas aos costões rochosos, são chamados bancos naturais, constituindo um rico ecossistema que abrange não só

os mexilhões, mas também um grande número de organismos vegetais e animais que vivem a eles associados, principalmente cracas, poliquetas, anfípodes, pequenos caranguejos e gastrópodes, bem como algas verdes, pardas e vermelhas. A maior concentração dos mexilhões ocorre na parte inferior da região entre marés, até um metro de profundidade, região do banco natural em que o recrutamento (fixação de indivíduos jovens) é mais intenso (MARQUES, 1988).

Fenotipicamente, os mexilhões são constituídos por duas conchas calcárias ou *valvas*, as quais encerram o corpo propriamente dito. A principal medida utilizada na determinação do crescimento dos mexilhões é o comprimento das valvas, definido com a maior dimensão do animal, correspondendo ao eixo que vai do umbo (porção terminal anterior) à linha que tangencia a extremidade posterior das valvas. Em moluscos bivalves o crescimento é avaliado preferencialmente pelo comprimento, e não pelo peso, devido aos freqüentes erros de pesagem causados pela água retida dentro das valvas (MARQUES, 1998).

As valvas são abertas pelo ligamento e fechadas por ação dos músculos adutores. Em sua superfície contém linhas de crescimento que representam as etapas de crescimento do animal. Essas linhas de crescimento são visíveis a olho nu e podem ser lisas e suaves (Mitolídeos) ou muito ásperas (Ostreídeos). A região oposta ao umbo é a posterior onde estão localizados os sífões, inalante e exalante. Na região ventral está localizado o bisso. Essa estrutura está presente em muitas espécies e serve para a locomoção ou fixação do animal ao substrato (HELM et al., 2004; LEAL, 2008).

Perna perna é o maior mitilídeo brasileiro (KLAPPENBACH, 1965), podendo sua valva atingir até 140 mm de comprimento. Popularmente recebe vários nomes, como mexilhão, marisco das pedras, ostra de pobre, marisco preto, etc.. Não apresenta dimorfismo sexual externo. Os machos podem ser distinguidos das fêmeas, internamente quando estão sexualmente maduros, pela coloração das gônadas que se apresentam branco leitosas, enquanto que nas fêmeas a coloração é vermelho tijolo (HENRIQUES, 2004).

A reprodução ocorre através de fecundação externa, no ambiente aquático. Na desova a emissão dos gametas é estimulada por fatores físicos ou climáticos, ocorrendo principalmente pelo aumento na concentração de nutrientes no meio e pela

variação repentina da temperatura ou da salinidade da água. Os casos de hermafroditismo nessa espécie são bastante raros (HENRIQUES, 2004).

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA ESPÉCIE

Filo Mollusca

Classe Bivalvia

Subclasse Pteriomorphia

Superordem Mytilida

Ordem Mytiloida

Família Mytilidae

Gênero *Perna*

Espécie *Perna perna* (Linnaeus, 1758)

2.3 GÊNERO *Cryptosporidium*

2.3.1 Histórico

Tyzzar (1907) relatou a infecção por um protozoário frequentemente encontrado nas glândulas gástricas de camundongos de laboratório, sugerindo a denominação de *Cryptosporidium muris*. Descreveu, ainda, estádios de desenvolvimento assexuados, sexuados e esporogonia, todos de localização intracelular, porém extra citoplasmático, além da eliminação de oocistos esporulados nas fezes. Já em 1910, o mesmo autor descreveu essa espécie com maiores detalhes, classificando-a como *C. muris* e ainda sugeriu que esporozoítos oriundos de oocistos que se desenvolveram no epitélio gástrico podem ser fonte de auto-infecção.

Este mesmo autor em 1912 observou um protozoário semelhante a *C. muris* no intestino delgado de camundongos e através da produção de infecção experimental

com *C. muris* e com o isolado do intestino, estabeleceu infecções isoladas no estômago com *C. muris*, e no intestino, com essa nova espécie, que foi denominada *C. parvum*.

O primeiro relato da infecção em aves foi feito pelo mesmo Tyzzer (1929) no epitélio cecal de pintos. Nessa ocasião o parasito foi descrito como morfológicamente idêntico a *C. parvum*, sendo considerada, por esse autor, uma variedade biológica de uma única espécie.

Em 1955, Slavin relatou a infecção na parte terminal do intestino delgado de perus que tiveram quadro clínico de diarreia. Com auxílio de raspados de mucosa corados pelo método de Mac Neal, descreveu morfológicamente os estádios endógenos do parasito e o denominou como *C. meleagridis*.

Desde o relato de Slavin (1955), a criptosporidiose foi diagnosticada nas aves em 1974 por Proctor e Kemp, e em 1975 por Fletcher et al. Desde então, constitui uma das principais infecções por protozoários nas aves (GOODWIN; BROWN, 1988), sendo diagnosticada nos tratos intestinal, respiratório e urinário de 11 espécies aviárias (GOODWIN, 1989).

Foi somente na década de 70, após o primeiro relato da infecção em bovinos (PANCIERA et al., 1971) e em humanos (MEISEL et al., 1976; NIME et al., 1976), que a criptosporidiose veio a despertar interesses médico e veterinário, passando de uma infecção supostamente rara e oportunista, a uma importante causa de infecções intestinais e respiratórias em mamíferos e aves (TZIPORI, 1983; GOODWIN, 1989).

Levine (1980) descreveu as espécies *C. rhesi* relatada por infectar macacos *Rhesus*, e *C. serpentis* por ser patogênica para cobras. Um ano depois, (HOOVER et al., 1981) denominaram *C. nasorum* como uma espécie nova encontrada em *Naso lituratus*. Mais tarde, Current et al. (1986) descreveram *C. baileyi*, localizado na bursa de Fabrícus e cloaca dos frangos. Definindo ainda a caracterização morfológica e o ciclo biológico completo.

Com o avanço da biologia molecular na década de 90, Champlaud et al., (1998) avaliaram a similaridade entre *C. meleagridis* e *C. parvum*. Porém, estudos prévios determinaram que as duas espécies não eram responsáveis por transmissão cruzada entre aves e mamíferos. No mesmo ano, Sargent et al. (1998), através de dados morfobiológicos e evidência molecular sugeriram que *C. felis* seja uma espécie distinta,

o mesmo acontecendo para *C. canis* (FAYER et al., 2001). Anteriormente, Pavlasek (1999) caracterizou morfometricamente uma espécie localizada no proventrículo de frangos, descrevendo-a como *C. galli*. Mais recentemente Ryan et al. (2003) redescreveram esta espécie, adicionando dados biológicos e moleculares que sustentam a descrição feita anteriormente, e a distingui completamente de *C. baileyi*.

Morgan et al. (2002) descreveram *C. hominis* para humanos, como um genótipo da espécie *C. parvum* previamente determinado. Em suínos, dados genéticos e biológicos suportaram a descrição de *C. suis* por Ryan et al. (2004) como um dos dois genótipos encontrados neste animal.

Os relatos da criptosporidiose têm aumentado consideravelmente nas várias espécies animais nos últimos 20 anos, inclusive no homem, gerando um aumento proporcional no número de pesquisas visando à elucidação de vários aspectos relacionados à infecção, principalmente no que se refere à taxonomia, especificidade, epidemiologia, patogenia, diagnóstico e tratamento.

2.3.2 Classificação

Várias classificações taxionômicas já foram propostas desde a descoberta das primeiras formas do protozoário e das várias espécies descritas até o presente momento. A classificação apresentada por Corliss (1994), apesar de ser a mais simplificada, representa a classificação proposta atualmente, a saber:

Império Eukariota

Reino Protozoa

Filo Apicomplexa

Classe Coccidia

Família Cryptosporidiidae

Gênero *Cryptosporidium*

2.3.3 Ciclo biológico

O ciclo biológico do *Cryptosporidium* é similar ao de outros coccídios, consistindo basicamente nos estágios de esquizogonia, gametogonia e esporogonia localizados na planura estriada (FAYER; UNGAR, 1986).

Após a ingestão de oocistos pelo hospedeiro, ocorre a excitação destes que ao contrário do que ocorre em outros coccídios, não necessita da presença de enzimas digestivas, condições redutoras e sais biliares (FAYER; LEEK, 1984), embora a presença de bile aumente a percentagem de excitação (SUNDERMANN et al., 1987). Devido a essa diferença, infecções respiratórias e em outros sítios extra-intestinais podem resultar da excitação na ausência de condições necessárias para que a mesma ocorra em outros coccídios (FAYER; LEEK, 1984).

Cryptosporidium foi considerado como um parasito de localização extracelular (TYZZER, 1912), até que em observações realizadas por Birt e Smith (1980), foi comprovado que sua localização é intracelular, porém extracitoplasmática, dentro de um vacúolo parasitófago formado por uma membrana derivada das microvilosidades da célula epitelial do hospedeiro (ITAKURA et al., 1985; MARCIAL; MADARA, 1986).

Segundo O'Donoghue (1995) após a excitação, os esporozoítos aderiram a superfície da célula epitelial e logo se diferenciaram em trofozoítos. Esses últimos através de divisão nuclear maturam, dando origem a merontes de primeira geração com oito merozoítos, que no caso de *C. parvum* (CURRENT; REESE, 1986) e *C. baileyi* (CURRENT et al. 1986), puderam ter desenvolvimento cíclico dando origem mais de uma vez a merontes de primeira e de segunda geração com quatro merozoítos. *Cryptosporidium baileyi*, além destas, apresenta ainda uma terceira geração de merontes com oito merozoítos (CURRENT et al., 1986).

Merozoítos de segunda ou de terceira geração se diferenciaram a estádios sexuais representados por microgametócitos e macrogametócitos, que formarão respectivamente, microgametas e macrogametas. Após fecundação formam-se os zigotos que por sua vez passam a oocistos (TZIPORI, 1998).

Aproximadamente 20% dos oocistos de *Cryptosporidium* não formaram uma parede de duas camadas resistente ao ambiente externo e sim uma única membrana envolvendo os quatro esporozoítos (CURRENT, 1985). Esses oocistos de parede delgada foram responsáveis pela excitação ainda no hospedeiro, dando origem aos merozoítos de primeira geração, por auto-infecção (CURRENT et al., 1986).

2.3.4 Diagnóstico laboratorial

O tamanho dos oocistos e outros estádios de desenvolvimento de *Cryptosporidium* são consideravelmente pequenos quando comparados a outros coccídios, além de serem morfológicamente similares a células leveduriformes. Portanto, métodos qualitativos e quantitativos têm sido descritos para a detecção de estágios de desenvolvimento de espécies do gênero *Cryptosporidium* em tecidos e fezes (CURRENT, 1990; WEBSTER, 1993).

A Estádios teciduais

Durante muito tempo, o diagnóstico da criptosporidiose baseou-se nos achados dos estágios endógenos em cortes histológicos principalmente nos tecidos do intestino, traquéia, e rim obtidos por biópsia ou necropsia (KIRKPATRICK; FARREL, 1984).

Nos cortes histológicos, os estádios endógenos do *Cryptosporidium* apareceram, quando corados pela hematoxilina e eosina (HE), como pequenos corpos basofílicos na superfície das células epiteliais. Amostras provenientes de biópsias ou necropsias deveriam ser rapidamente fixadas para impedir o desenvolvimento de autólise, descamação do epitélio e conseqüente despreendimento dos estádios parasitários (O`DONOGHUE, 1985).

Várias técnicas de coloração podem ser utilizadas para identificação do parasito em tecidos, como Hematoxilina e Eosina (HE) (MEUTEN et al., 1974; GOODWIN; BROWN, 1988a), Giemsa e azul de toluidina (MEUTEN et al., 1974), ácido periódico de Schiff (PAS), Grocott (BIRD; SMITH, 1980) e Ziehl-Neelsen modificado (BEGNESCOU, 1987).

O exame através de microscopia eletrônica de transmissão permitiu que os vários estádios endógenos fossem identificados, revelando a estrutura interna deste agente etiológico parasito (BIRD; SMITH, 1980).

B Oocistos

Vários métodos de coloração têm sido empregados para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes, com a vantagem de serem simples, mais baratos, mais rápidos e usualmente mais sensíveis que o exame de cortes histológicos (CURRENT, 1985).

Segundo Current (1985) *Cryptosporidium*, quando armazenado sob refrigeração em dicromato de potássio a 2,5% ou formalina a 10%, permanece viável para fins de diagnóstico, por pelo menos um ano.

Ao utilizar o método de concentração em solução de “Sheather” e coloração de esfregaços com Giemsa, Anderson (1981) encontrou um maior número de oocistos e uma melhor preservação de sua morfologia na técnica de concentração, enquanto que na técnica de Giemsa houve distorção e retração dos oocistos, algumas vezes com dificuldade de observação das estruturas internas permanecendo como forma negativa do oocisto no esfregaço de fezes (BOMFIM, 1989).

Henriksen e Pohlenz (1981) utilizaram a coloração de Ziehl-Neelsen modificado para diferenciar leveduras de oocistos e com isso evitar diagnósticos falsos positivos. Nesta técnica, os oocistos apareceram como corpos vermelhos, claramente distinguidos

contra um fundo verde. Alguns oocistos são evidenciados por um número variável de pontos azul escuro ou amarronzado, sendo que as leveduras não se coraram.

A coloração pela técnica da safranina-azul de metileno, foi utilizada por Baxby et al. (1984) e mostrou ser mais sensível que as técnicas álcool-ácido resistentes e a de Giemsa. Os oocistos se coraram de laranja-róseo e os esporozoítos adquiriram uma coloração um pouco mais escura e às vezes se arranjaram na periferia, dando aos oocistos aparência de ferradura.

Nichols e Thom (1984) descreveram a técnica de auramina-fenol, onde os oocistos coravam-se de verde amarelado fluorescente em microscópio de epifluorescência, sendo observados diferentemente das técnicas citadas anteriormente.

Técnicas imunológicas como o teste de aglutinação em látex (POHJOLA et al., 1986), imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais (STERLING et al., 1986) e imunofluorescência indireta (STIBBS; ONGERTH, 1986), também puderam ser utilizadas para detecção de oocistos nas fezes, com bons resultados.

C Diagnóstico sorológico e molecular

Entre os testes sorológicos empregados para o diagnóstico da criptosporidiose, a imunofluorescência indireta e a técnica de ELISA foram mais eficientes, sendo até o momento as mais utilizadas (SRÉTER, et al., 1997).

A partir da década de 90, o diagnóstico da criptosporidiose através de técnicas moleculares vem aumentando significativamente, principalmente com utilização do método de reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção e diferenciação entre espécies do gênero *Cryptosporidium* (AWAD-EL-KARIEM et al., 1994; LENG et al., 1996). Atualmente, esta técnica tem sido identificada e usada para detecção do *Cryptosporidium* no ambiente, sendo muito utilizada em investigações epidemiológicas (MORGAN; THOMPSON, 1998).

2.3.5 Patogenia

Com o aumento dos relatos de infecções em humanos e animais, o interesse pelo *Cryptosporidium* cresceu acentuadamente no campo da saúde pública e veterinária, não somente pelo fato dos animais serem vistos como fonte de infecção para os humanos, uma vez que este organismo pode causar perdas econômicas nas criações animais, ser um dos principais agentes causadores de diarreia infecciosa em crianças de 0 a 5 anos e ser de difícil controle. Infecções por *Cryptosporidium* já foram relatadas na maioria dos animais domésticos, assim como, numa grande variedade de animais silvestres e de cativeiro, desde sua primeira identificação por Tyzzer. A maioria das infecções foi descrita em mamíferos e atribuída a fonte bovina de *C. parvum* (O'DONOGHUE, 1995; OSHIRO et al., 2000), animais jovens aparentaram ser mais susceptíveis à infecção e à doença; enquanto infecções em animais adultos tem sido freqüentemente assintomáticas ou não ocorreram. Similarmente a criptosporidiose humana, os sintomas comuns aos animais têm sido diarreia aquosa que leva à desidratação, perda de peso, febre, e inapetência. A maioria dos animais imunocompetentes tem se recuperado em uma a duas semanas após a infecção com fluidoterapia de suporte (O'DONOGHUE, 1995).

2.3.6 Especificidade aos hospedeiros vertebrados e transmissão cruzada

Durante um longo período de tempo, o critério utilizado para classificação do parasito era a associação ao seu hospedeiro, pois se pensava tratar de espécies específicas, tendo sido assinaladas mais de 20 espécies do gênero *Cryptosporidium* (CHERMETTE; BOUFASSA-OUZROUT, 1988).

A classificação taxionômica dos protozoários vem sendo baseada em várias características fenotípicas, como, fatores morfológicos encontrados à microscopia óptica ou eletrônica, ciclo biológico, e a presumida especificidade ao hospedeiro

(FAYER et al., 2000). Para coccídios, fatores morfológicos dos oocistos na microscopia óptica têm sido mais utilizados do que as outras características para designar gêneros e espécies (MORGAN et al., 2000; XIAO et al., 1999).

Utilizando critérios morfológicos e especificidade ao hospedeiro, 10 espécies de *Cryptosporidium* têm sido reconhecidas pela maioria dos autores. Está incluído neste grupo *C. parvum* para a maioria dos mamíferos, *C. muris* para os roedores, *C. andersoni* para ruminantes, *C. felis* para felídeos, *C. nasorum* para peixes, *C. wrairi* para cobaios, *C. meleagridis* e *C. baileyi* para aves, *C. serpentis* para cobras e lagartos, e *C. saurophilum* para os lagartos (FAYER et al. 2000). Além desses critérios, Fayer et al., (2001) utilizando estudos moleculares baseados no DNA, validou mais três espécies: *C. canis* para cães, *C. molnari* para peixes, e *C. hominis* para humanos, porém deve-se levar em consideração a lei da prioridade para que uma mesma espécie não seja descrita por mais de uma vez (XIAO et al., 2004).

A maioria dos estudos de transmissão cruzada (especialmente antes de 1990) foi conduzida sem confirmação da identificação genética do isolado (O'DONOGHUE et al., 1987). O que tem sido demonstrado experimentalmente é que *Cryptosporidium* de mamíferos e aves não infectam répteis e vice-versa, *Cryptosporidium* de cobras não infectam mamíferos (O'DONOGHUE et al. 1995). Isto demonstra que espécies morfolologicamente distintas, tal como *C. serpentis*, são também hospedeiros específicos ou específicos para uma classe de hospedeiro particular (ex. répteis) (GRACZYK; CRANFIELD, 1998). Estudos recentes sugerem que o genótipo humano (*C. hominis*) é restrito de humanos e possivelmente de primatas (MORGAN et al., 2002) e que o genótipo bovino é infeccioso para a maioria dos mamíferos (MCLAUCHLIN et al., 2000).

Embora mais de 20 diferentes espécies de *Cryptosporidium* tenham sido denominadas na literatura, estudos biológicos, e genéticos do RNA ribossomal sugerem que as três maiores, espécie gástrica e/ou cloacal) (*C. muris*, *C. serpentis*, *C. andersoni* e *C. baileyi*, em roedores, bovinos, répteis e galinhas, respectivamente) são distintas das menores, *C. parvum* intestinal (ambos o genótipos humano 1 e o bovino, e também o genótipo humano 2) e suas espécies relativas *C. felis*, *C. meleagridis* (observada em perus), *C. wrairi* (isolada de cobaios) e possivelmente *C. saurophilum* (observada em lagartos), e *C. nasorum* de peixes. Como dado, a maioria das infecções humanas

ocorre com *C. parvum* (tipo 1 e algumas tipo 2). Em adição, *C. meleagridis*, *C. felis* e um genótipo canino de *C. parvum*, foram associados com infecções humanas e/ou diarreia em adultos com AIDS como em crianças em áreas em desenvolvimento (XIAO et al., 2000; PEDRAZA-DIAZ et al., 2000).

2.3.7 Epidemiologia

Cryptosporidium despertou grande interesse em saúde pública após o grande surto que ocorreu em 1993 em Milwaukee nos EUA quando este foi carregado pela água (MACKENZIE et al., 1995) e rapidamente tornou-se reconhecido como um dos patógenos mais sérios e de difícil controle já relatados. Vários relatos subsequentes demonstraram que o agente etiológico em questão é de distribuição cosmopolita e potencialmente zoonótico (CURRENT; GARCIA, 1991; MOSIER; OBERST, 2000). Criptosporidiose está associada à diarreia moderada a grave que é tipicamente autolimitante no hospedeiro imunocompetente, mas frequentemente persistente, e tem sido debilitante no hospedeiro imunocomprometido. Portanto, *Cryptosporidium* tem sido um sério problema para pacientes portadores da SIDA, tornando-se um fator determinante e, com isso, chamando a atenção da medicina humana. Por outro lado, pelo fato do diagnóstico da criptosporidiose ser frequentemente desconsiderado, fora dos imunodeficientes, e pelo fato de vários laboratórios não testarem amostras para *Cryptosporidium*, a não ser que seja especificamente requerida, a doença em humanos imunocompetentes continua não sendo relatada (CDC, 1999).

A dose infectante é muito baixa, sendo necessário apenas um único oocisto para produzir infecção e doença em hospedeiros susceptíveis (PEREIRA, et al. 2002). Oocistos são comumente transmitidos pela rota fecal-oral pelo contato direto hospedeiro-hospedeiro, e contaminação indireta da comida ou água; no entanto, a transmissão de oocistos por aerossol já foi relatada (HOJLYNG, et al. 1987). Casos de transmissão humano-humano já foram relatados entre membros da mesma família, parceiros sexuais, crianças em creches, pacientes e funcionários de hospitais

(CURRENT; GARCIA, 1991). A transmissão zoonótica foi confirmada por estudos epidemiológicos envolvendo animais de companhia e de produção, e por infecção acidental de tratadores de animais (ANDERSON et al., 1982; REESE et al., 1982), ou mesmo por contato ou manuseio inadequado do material fecal positivo em laboratório. O alimento manuseado por uma pessoa infectada, assim como o alimento que foi exposto à água contaminada, tem sido considerado fontes de criptosporidiose de origem alimentar (QUIROZ et al., 2000). O alimento cultivado em solo fertilizado com fezes de animais pode também ser considerado como uma possível fonte de infecção para humanos. Os oocistos de *Cryptosporidium* podem permanecer viáveis na água por até 140 dias (HOODA et al., 2000) e são muito resistentes à maioria dos desinfetantes comuns (CAMPBELL et al., 1982) fazendo-os de difícil destruição pelo tratamento de cloração convencional.

Surtos foram associados à contaminação de águas de superfície, correntes aquáticas, piscinas, e reservatórios públicos de água. Nos EUA, o parasito foi identificado em 80-97% de todas as águas de superfície como rios, lagos, e poços (LECHAVALLIER et al., 1991). Estudos demonstraram que mais de 97% das águas de superfície que servem às estações de tratamento de água e 54% das águas tratadas (filtradas e cloradas) contém baixos números de oocistos de *Cryptosporidium* (LECHAVALLIER et al., 1991). Da mesma forma, águas de recreação como: piscinas, chafariz, poços e fontes podem estar contaminados com fezes de animais ou humanos infectados (KRAMER et al., 1998).

Apesar dos surtos carreados pela água terem sido atribuídos a fontes agropecuárias, particularmente o gado, devido à sua alta prevalência de infecção entre os vitelos, essas implicações foram raramente confirmadas durante as investigações de surtos. Com os avanços das técnicas moleculares e o desenvolvimento de detecções altamente sensíveis e métodos genotípicos, melhor contribuição das fontes e causas de *Cryptosporidium* estão sendo finalmente atingidas. O risco potencial da infecção por *Cryptosporidium* na vida selvagem, e em animais de companhia é incerto, mas de preocupações crescentes. Houve relatos da infecção de gatos e cães (MTAMBO et al., 1991), e a infecção por *Cryptosporidium* foi encontrada numa larga gama de animais silvestres (SIMPSON, 2002), representando fonte de significância potencial de

contaminação ambiental e reservatório da doença para criações de animais e até mesmo para os humanos.

2.3.8 *Cryptosporidium* como protozoário de veiculação hídrica

O gênero *Cryptosporidium* 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 (FAYER et al., 2004b; THOMPSON et al., 2004; APPLEBEE et al., 2005). Este protozoário é transmitido pela rota fecal-oral, após os estágios infectantes de oocistos de *Cryptosporidium* serem ingeridos por indivíduos susceptíveis.

A forma de transmissão para os seres humanos pode ocorrer de diversas formas como: contato direto, hospedeiro para hospedeiro, ou indireto, através de água ou alimentos contaminados; superfícies contaminadas e ou veiculados mecanicamente por artrópodes (FAYER et al., 2000a; TZIPORI; WARD, 2002; THOMPSON et al., 2004). A veiculação hídrica de protozoários patogênicos tornou-se um assunto de extrema relevância em saúde pública sendo discutido mundialmente mesmo em países desenvolvidos, onde há um elevado grau de saneamento básico (OLIVEIRA, 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 EUA, 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 através de alimentos devidamente documentados e atribuídos ao *Cryptosporidium*, os dados de ocorrência do mesmo em amostras hídricas, provêm em sua maioria de pesquisas científicas (FRANCO, 2007).

Esse protozoário apresenta características comuns que influenciam a epidemiologia desta parasitose. A dose infectante é pequena; para o *Cryptosporidium* a ID₅₀, 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 *C. parvum*, o ID₅₀ variou de 9 a 1024 oocistos (OKHUYSEN et al., 1999).

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

Os oocistos do protozoário mantêm sua capacidade infectante inalterada por longos períodos e em condições inóspitas. Apresenta elevado potencial para a dispersão ambiental de cistos, uma vez que um grande número de formas parasitárias é eliminado 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, o que pode propiciar a contaminação da água destinada ao consumo humano, os alimentos e as áreas recreacionais e costeiras (FAYER et al., 2004; CACCIÒ et al., 2005).

A criptosporidiose afeta indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos. As infecções ocasionadas por este protozoário patogênico intestinal pode representar uma ameaça à saúde humana; no caso da 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).

Segundo Leal (2008), para auxiliar o entendimento do mecanismo de controle deste protozoário no ambiente é necessário para que medidas corretivas e profiláticas possam ser tomadas. Sendo assim, mais estudos são necessários para a compreensão das fontes de contaminação, concentrações, sobrevivência e transporte deste protozoário no ambiente (ROSE et al., 2002; FAYER et al., 2004), com objetivo de

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 DESENVOLVIMENTO

3.1 CORRELAÇÃO ENTRE DADOS PARASITOLÓGICOS E BIOMÉTRICOS DE MOLUSCOS BIVALVES COLETADOS NA PONTA DO TINGUÍ, MANGARATIBA, RIO DE JANEIRO*

**CORRELAÇÃO ENTRE DADOS BIOMÉTRICOS E PARASITOLÓGICOS DE
MEXILHÕES (*Perna perna*) DA PONTA DO TINGUÍ, MANGARATIBA, RIO DE
JANEIRO, BRASIL***

*CORRELATION BETWEEN BIOMETRIC AND PARASITOLOGIC DATA OF MUSSEL (*Perna perna*) FROM PONTA DOTINGUÍ, MANGARATIBA, RJ, BRAZIL*

Tatiana Silveira Feijó Cardozo¹, Ícaro Rodrigues dos Santos², Bruno Pereira Berto³, Sergian Vianna Cardozo⁴, Eliana de Fatima Marques de Mesquita⁵ e Carlos Wilson Gomes Lopes⁶

ABSTRACT. Cardozo T.S.F., Santos I.R., Berto B.P., Cardozo S.V., Mesquita E.F.M. & Lopes C.W.G. [Correlation between biometric and parasitologic data of mussel (*Perna perna*) from Ponta do Tinguí, Mangaratiba, RJ, Brazil.] Correlação entre dados biométricos e parasitológicos de mexilhões (*Perna perna*) da Ponta do Tinguí, Mangaratiba, RJ, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34 (1): 00-00, 2011. Escola de Ciências da Saúde, Curso de Especialização em Ciências, Laboratório Clínico e Diagnóstico *in Vitro*, Universidade do Grande Rio, Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, 25071-202, RJ, Brasil. E-mail: tatiana.cardozo@ymail.com

The present study was to correlate the biometric and parasitological data obtained of shellfish collected from Ponta do Tinguí, Mangaraiba, RJ, Brazil. Initially, a total of 100 mussels was sent to laboratory for evaluation of biometric parameters by measuring the valves on their thickness, width and length, and also to verify the total weight or biomass. Then parasitological tests were performed through the techniques of concentration and staining to determine the presence of *Cryptosporidium* oocysts. In all samples of the biomass of mussels processed and submitted to parasitological assessment noted the presence of *Cryptosporidium* oocysts. When correlated by the Spearman correlation coefficient, biometric data and parasitological observed a negative correlation between the data analyzed, especially when confronted with the total weight of biomass and the average number of *Cryptosporidium* oocysts. Featuring an inversely proportional relationship between weight and total biomass found, and the number of oocysts present in this biomass. The negative correlation between parasitological and biometric data shows that the

environmental contamination present in the study area is directly related to the growth rate of mussels as they filter-feeding animals, which is performed without any selective capacity.

KEY WORDS. Mussel, biomass, *Cryptosporidium*, oocysts, Spearman correlation.

*Recebido em 3 de março de 2011.

Aceito em...

¹Nutricionista. *M. Tecnol. Alim.* Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal), Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, 24230-340, RJ. E-mail: tatiana.cardozo@ymail.com

²Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, 25071-202, RJ. E-mail: icaro.rdg@gmail.com

³Biólogo. *Dr. CsVs* Escola de Ciências da Saúde, Curso de Especialização em Ciências do Laboratório Clínico e Diagnóstico *in vitro*, UNIGRANRIO, Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, 25071-202, RJ. E-mail: bertobp@oi.com.br

⁴Médico-veterinário. *Dr. Pathol.* Escola de Ciências da Saúde, Curso de Especialização em Ciências do Laboratório Clínico e Diagnóstico *in Vitro*, UNIGRANRIO, Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, RJ 25071-202, Brasil. E-mail: sergianvc@gmail.com

⁵Médica-veterinária. *Dr. Zool.* Departamento de Tecnologia de Alimentos, FV, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niteroi, 24230-340, RJ. E-mail: elianafmm@uol.com.br

⁶Médico-veterinário. PhD, LD, Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 km 7, Seropédica, 23890-000, RJ. E-mail: lopescwg@ufrj.br – bolsista CNPq.

RESUMO. O presente trabalho teve como objetivo correlacionar os dados biométricos e parasitológicos obtidos de moluscos bivalves coletados na Ponta do Tinguí, Mangaratiba, RJ. Um total de 100 mexilhões foi encaminhado ao laboratório para, inicialmente, serem submetidos à avaliação dos parâmetros biométricos, através da mensuração das valvas quanto à espessura, largura e comprimento, e verificação do peso total e de biomassa. Em seguida foram realizadas as análises parasitológicas através das técnicas de concentração e coloração, para determinação da presença de oocistos de *Cryptosporidium*. Em todas as amostras da biomassa dos mexilhões

processadas e submetidas à avaliação parasitológica foi observado à presença de oocistos de *Cryptosporidium*. Quando correlacionado, através do coeficiente de Spearman, os dados biométricos e parasitológicos tiveram correlação negativa entre os dados analisados, especialmente, quando confrontados ao peso total e da biomassa com a quantidade média de oocistos de *Cryptosporidium*, caracterizando haver uma relação inversamente proporcional entre o peso total e de biomassa encontrado, e o número de oocistos presentes nessa biomassa. A correlação negativa entre os dados biométricos e parasitológicos demonstra que a contaminação ambiental presente na área estudada, esta diretamente relacionada com a taxa de crescimento dos mexilhões, uma vez que estes animais se alimentam por filtração, sendo esta realizada sem nenhuma capacidade seletiva.

PALAVRAS-CHAVE. Mexilhão, biomassa, *Cryptosporidium*, coeficiente de Spearman.

INTRODUÇÃO

A degradação dos ambientes naturais é originária das atividades humanas em diferentes vertentes. Além da contaminação do solo, diminuição da cobertura vegetal e perda da biodiversidade relacionada à alteração de ecossistemas, a contaminação de cursos d'água por poluentes de diversas naturezas também se inclui como uma das mais preocupantes formas de agressão ao meio ambiente. Dentre os poluentes, podem-se destacar aqueles oriundos de dejetos humanos e de animais ocasionados pela falta de saneamento básico ou mesmo de infra-estrutura junto as grandes criações de animais. A matéria orgânica gerada por eles, quando não tratadas podem ser carregadas, para córregos vizinhos, muitos deles transformados em valas negras que por sua vez são despejados em grandes rios por seus tributários. Desta maneira estes resíduos não tratados chegam das áreas estuarinas aos manguezais.

Dentro destes manguezais existe toda uma fauna e flora adaptadas a este tipo de ecossistema onde, moluscos bivalves caracterizados como filtradores são capazes de reter minúsculas partículas oriundas dos dejetos eliminados previamente por humanos e animais. Essa contaminação pode comprometer toda a viabilidade do desenvolvimento da aquíicultura ou contaminar o consumidor final dos crustáceos e moluscos, interferindo assim diretamente com a saúde da população que utiliza estes animais na sua alimentação.

A expectativa de crescimento desta atividade, como fonte de alimento, torna evidente a necessidade e importância do controle de qualidade das águas destinadas à criação de moluscos bivalves, bem como o controle sanitário desses organismos visando garantir a qualidade deste produto no mercado (Galvão et al. 2006). Sobretudo, se considerarmos a crescente preocupação dos consumidores quanto à sanidade dos produtos alimentícios e o fato dos produtos pesqueiros, de maneira geral serem altamente perecíveis e susceptíveis a contaminação proveniente do meio no qual estão inseridos.

Avaliações da qualidade sanitária de águas e mariscos têm sido realizadas através de programas de monitoramento de microrganismos indicadores (bioindicadores microbiológicos), que avaliam as respostas da exposição destes a contaminante (Melancon 1995). Desta forma, os indicadores da qualidade ambiental têm sido utilizados para detectar a existência ou ausência de organismos patogênicos tanto no ambiente como nos produtos dele provenientes (Regan et al. 1993, Barardi et al. 2001, Mujika et al. 2003).

Dentre os marcadores de contaminação do produto, os coliformes fecais e alguns protozoários são indicadores específicos e apresentam elevada correlação positiva com a contaminação fecal por animais de sangue quente e, a alimentação por filtração realizada pelos mexilhões, concentra os microorganismos presentes no ambiente marinho (Pádua 2003).

Tratando-se separadamente do aspecto sanitário em todo esse desenvolvimento, o presente trabalho teve como objetivo correlacionar os dados biométricos e parasitológicos obtidos de moluscos bivalves coletados na Ponta do Tinguí, Mangaratiba, RJ.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo se concentrou na região de Mangaratiba, onde foram coletados os mexilhões diretamente de bancos naturais localizados na Ponta do Tinguí, área pertencente à região costeira da própria Baía de Sepetiba, RJ.

A Baía de Sepetiba está localizada no litoral sudeste do estado do Rio de Janeiro abrangendo os municípios do Rio de Janeiro, Itaguaí e Mangaratiba. Esta baía funciona como um sistema estuarino apresentando águas menos salinas e mais quentes durante a maré baixa na parte mais próxima a costa e águas mais frias e mais salinas em direção ao largo (Signorini 1980). Esta

bacia hidrográfica drena municípios densamente povoados e sem infra-estrutura sanitária. Também abriga um parque industrial. Esses fatores fazem com que a baía de Sepetiba seja um local altamente impactado por poluição de efluentes domésticos com esgoto *in natura* e agentes químicos como metais pesados, óleo de embarcação.

A baía de Sepetiba juntamente com suas áreas de mangue e zonas estuarinas constitui um criadouro natural. Dado à sua condição bem abrigada ao longo da costa brasileira, e seu histórico de região marisqueira, a baía é naturalmente um local propício para o desenvolvimento de ostras, mexilhões, e sururus, camarões, e peixes, sendo a atividade pesqueira um importante suporte econômico e social para esta região.

Local de experimentação

As amostras de mexilhões (*Perna perna*) coletadas foram analisadas no Laboratório de Coccídios e Coccidioses- Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ), Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Biometria dos mexilhões

Foi mensurado, com auxílio de um paquímetro, um total de 100 mexilhões quanto ao comprimento, largura e espessura das valvas. Além desses dados, também foram aferidos o peso da biomassa e o peso total (biomassa e concha).

Análises parasitológicas

As amostras da biomassa dos moluscos bivalves foram trituradas e posteriormente homogeneizada em 20 mL de PBS pH 7.2, filtradas através de uma gaze dobrada quatro vezes, e a solução obtida foi centrifugada a 1500 rpm (250g) por 10 minutos. Após a centrifugação foi desprezado o sobrenadante e ajustado o sedimento a quantidade de 1,0 mL. Na sequência, o conteúdo de 20 µL do sedimento foi retirado, com auxílio de uma pipeta automática e colocado entre lamina e lamínula para posterior avaliação e quantificação de toda a extensão da lamínula quanto ao número de oocistos de *Cryptosporidium* presentes.

Para avaliação qualitativa parasitológica as amostras da biomassa dos mexilhões foram submetidas às técnicas de centrífugo-flutuação de Sheather em solução saturada de açúcar

(Anderson 1981) e centrifugo-sedimentação formaldeído-éter (Richtie 1948). Com os sedimentos obtidos das amostras foram preparados esfregaços em lâminas que, posteriormente, foram corados pela técnica de safranina-azul de metileno (Baxby et al. 1984). Tanto a técnica de coloração quanto a de centrifugo-flutuação supracitada foram utilizadas para identificação fenotípica dos oocistos.

Fotomicrografia dos oocistos

As fotomicrografias dos oocistos presentes nas amostras oriundas dos moluscos bivalves foram feitas com a utilização de uma câmera Evolution MP 5.0 Colled, RTV acoplada ao microscópio triocular Nikon Eclipse E200, utilizando o programa Image Pro-Plus 6.0, em objetiva de imersão 100X.

Análise estatística

Para avaliação das variáveis não-paramétricas estudadas foi utilizado o coeficiente de correlação de postos de Spearman, segundo Sampaio (2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as amostras da biomassa dos mexilhões (*P. perna*) processadas e submetidas a avaliação parasitológica foi observado a presença de oocistos de *Cryptosporidium* demonstrando que existe contaminação ambiental, seja por fezes humanas ou animais.

Na figura 1 observa-se a correlação entre o número de oocistos por grama de biomassa e o peso da biomassa em gramas dos mexilhões *Perna perna*. Tais resultados observados no presente estudo foram semelhantes aqueles descritos por Furlan (2004) quando realizou a biometria de mexilhões de três diferentes pontos de coleta.

Quando utilizado o coeficiente de Spearman para determinar a correlação entre o número de oocistos de *Cryptosporidium*, por grama de biomassa e os parâmetros de biometria dos mexilhões foi observado uma correlação negativa entre os dados analisados, especialmente, quando confrontado o peso total e da biomassa com a quantidade média de oocistos de *Cryptosporidium*, caracterizando uma relação inversamente proporcional entre o peso total e de biomassa encontrado e o número de oocistos presentes nessa biomassa (Tabela 1). Segundo Cook

(1991) e Lira et al. (2000) o tamanho dos mexilhões pode ser diretamente relacionado a contagem microbiana apresentada pelo produto, uma vez que, os mexilhões se alimentam por filtração, sendo este processo realizado sem nenhuma restrição e dependente do tamanho do mexilhão.

Quayle & Newkirk (1989) demonstram que além da influência microbiana, o crescimento da concha esta diretamente relacionado a temperatura da água; quando esta temperatura é elevada o ano todo, o crescimento da concha ocorre de forma continua.

Os mexilhões em Ubatuba (SP) apresentam de acordo com Assumpção (1999) uma variação de tamanho entre 6,0 – 7,1 cm, após nove meses de cultivo, se cultivados com sementes extraídas de bancos naturais. Marques (1998) relata que, no litoral paulista, os mexilhões costumam ser comercializados a partir dos 5 cm de comprimento, não sendo vantajoso para o produtor, esperar os animais atingirem tamanhos maiores para comercializá-los, já que o crescimento, praticamente, estabiliza aos 6 cm, diferentemente do que ocorre em outros estados brasileiros.

Segundo Henriques (2001), o crescimento e a produtividade de mexilhões, tanto de cultivos quanto de bancos naturais, dependem de diversas variáveis como a temperatura, salinidade, circulação da água, densidade dos indivíduos, quantidade e qualidade de alimento disponível e baixa incidência de parasitas competidores e predadores.

CONCLUSÃO

A correlação negativa entre os dados biométricos e parasitológicos demonstra que a contaminação ambiental presente na área estudada, esta diretamente relacionada com a taxa de crescimento dos mexilhões, uma vez que estes animais se alimentam por filtração, sendo esta realizada sem nenhuma capacidade seletiva. Mesmo estes animais tendo alto potencial de depuração dos sedimentos filtrados, caso a contaminação ambiental seja persistente, ocorre uma influência significativa no desenvolvimento desses mexilhões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson B.C. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, .178:892-984, 1981.

- Assumpção A. *Estudo da viabilidade de criação de cooperativas dos produtores de mexilhão do litoral norte paulista*. Piracicaba, ESALQ, Departamento de Economia, Administração e Sociologia, 1999. 40p. (Relatório CES, 629).
- Barardi C.R.M., Santos C.S. dos & Simões C.M.O. Ostras de qualidade em Santa Catarina. *Cienc. Hoje*, 29: 70-73, 2001.
- Baxby, D.; Blundell, N. & Hart, C.A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *J. Hyg.*, 93:317-323, 1984.
- Cook D.W. Microbiology of bivalves molluscan shellfish. In: Ward, D.R.; Hackney, C. *Microbiology of marine food products*. New York, Van Nostrand Reinhold, 1991. Cap.2, p. 19-34.
- Furlan, E.F. *Vida útil dos mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos*. 2004, 106p. Dissertação (Mestrado) – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004. (Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-23112004-164608/pt-br.php>>).
- Galvão, J.A.; Furlan, E.F.; Salán, E.O.; Porto, E. & Oetterer, M. Características físico-química e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da água e dos mexilhões cultivados na região de Ubatuba, SP. *Cienc. Agrotec.*, 30: 1124-1129, 2006.
- Henriksen, S. A. & Pohlenz, J. F. L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet. Scand.*, 22: 594-596, 1981.
- Henriques, M.B. Resistência do mexilhão *perna perna* (linnaeus, 1758) proveniente de bancos naturais da baixada santista, a variações de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo. Rio Claro, 2004. 113p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Paulista Julio Mesquita Filho. Disponível em [www.ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/tese_henriques.pdf](http://ftp.sp.gov.br/ftppesca/tese_henriques.pdf).
- Lira, A.A.; Barros, G.C.; Lima, M.C.G. & Mota, R.A. Aspectos sanitários do ambiente aquáticos onde são capturados moluscos bivalves para consumo no Grande Recife, P.E. *Rev.Hig. Alim.*, v. 11, n.77, p.53-57, 2000.
- Marques, H.L.A. *Criação comercial de mexilhões*. São Paulo, Nobel, 1998. 111p.
- Melancon, M. J. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In: Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton Junior, G. A.; Cairns Junior, J. (Eds). *Handbook of ecotoxicology*. New York, Lewis Publishers, 1995. c. 11, p. 220-240.

- Mujika M., Calvo M., Lucena F. & Girones R. Comparative analysis of pathogens and potencial indicators in shellfish. *International journal of food microbiology*, n. 83, p. 75-85. Elsevier Science Ltd, 2003.
- Padua H.B. de. *Informações sobre os coliformes totais/fecais e alguns outros organismos indicadores em sistemas aquáticos: aquicultura*, 2003. 20p. Disponível em: <<http://www.setorpesqueiro.com.br>>. Acesso em: 12 ago. 2003.
- Quayle D.B. & Newkirk G.F. Farming bivalve molluscs methods for study and development. In: Sandifer P.A. *Advances in world aquaculture*. Montreal, The World Aquaculture Society, 1989. v.1, 249p.
- Regan P.M., Margolin A.B. & Watkins W.D. Evaluation of microbial indicators for the determination of the sanitary quality and safety of shellfish. *J. Shellfish Res.*, 12: 95-100, 1993.
- Ritchie L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull.US Armed, Medical Department*, 8: 1-326, 1948.
- Sampaio I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte, Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.

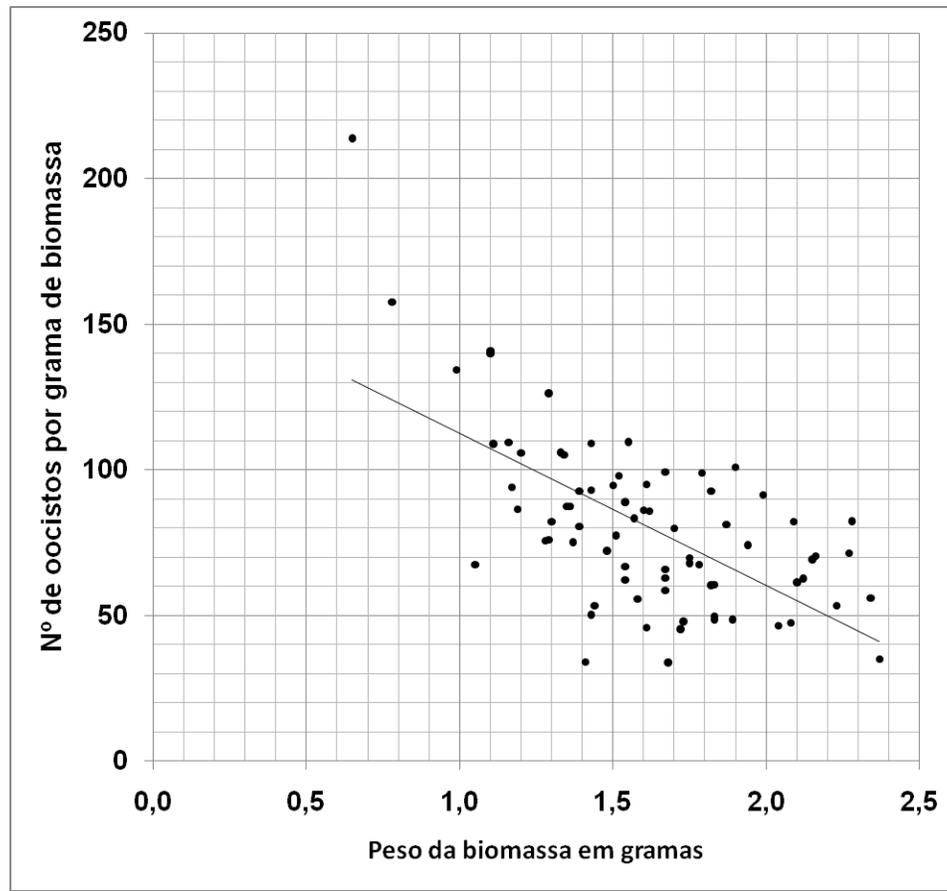


Figura 1. Correlação entre o número de oocistos por grama de biomassa e o peso da biomassa (em gramas) dos mexilhões (*Perna perna*).

Tabela 1. Correlação do número de oocistos de *Cryptosporidium* por grama de Biomassa dos mexilhões *Perna perna* com os parâmetros de biometria dos mexilhões.

		Parâmetros avaliados	Média	Coeficiente de Spearman ^a
		Nº de oocistos ^b	81	
Biometria	Dimensões	Espessura	2,2cm (1,8-2,8)	- 0,2834
		Largura	1,1cm (0,7-1,6)	- 0,2863
		Comprimento	4,0cm (3,5-4,7)	- 0,2867
	Peso	Total ^c	5,6g (2,8-9,2)	- 0,3237*
		Biomassa	1,6g	- 0,5608*

^aValor do coeficiente de postos de Spearman.

^bNúmero de oocistos de por grama de biomassa.

^cPeso total do mexilhão, incluindo concha e biomassa.

*Correlação negativa moderada entre o número de oocistos por grama de biomassa e o peso total e da biomassa.

3.2 UTILIZAÇÃO DO *Cryptosporidium* COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM MOLUSCOS BIVALVES CRIADOS EM CONDIÇÕES NATURAIS NA PONTA DO TINGUÍ, MANGARATIBA, RIO DE JANEIRO

UTILIZAÇÃO DO *Cryptosporidium* COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL EM *Perna perna* (BIVALVIA) CRIADOS EM CONDIÇÕES NATURAIS NA PONTA DO TINGUÍ, MANGARATIBA, RJ*

USE OF Cryptosporidium AS A BIOLOGICAL MARKER OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION IN BIVALVE MOLLUSCS RAISED IN NATURAL CONDITIONS AT PONTA DO TINGUÍ, MANGARATIBA, RJ

Tatiana Silveira Feijó Cardozo¹, Bruno Pereira Berto²; Sergian Vianna Cardozo³, Eliana de Fátima Marques de Mesquita⁴ & Carlos Wilson Gomes Lopes⁵

ABSTRACT. Cardozo, T.S.F., Berto, B.P., Cardozo, S.V., Mesquita, E.F.M. & Lopes, C.W.G. [Use of *Cryptosporidium* as a biological marker of environmental contamination in bivalve mollusks raised in natural conditions at Ponta do Tinguí, Mangaratiba, RJ.] Utilização do *Cryptosporidium* como marcador biológico de contaminação ambiental em moluscos bivalves coletados na Ponta do Tinguí, Mangaratiba, RJ. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 00 (0): 00-00, 2012. Escola de Ciências da Saúde, Curso de Especialização em Ciências do Laboratório Clínico e Diagnóstico *in vitro*, Universidade do Grande Rio, Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, RJ 25071-202, Brasil. E-mail: tatiana.cardozo@ymail.com

The dumping of untreated or treated sewage into rivers and seas affect the quality of these water bodies, it can introduce enteric pathogens humans or animals and contribute to increased levels of organic nutrients in these areas. The objective of this study was to use the genre *Cryptosporidium* as a biomarker of environmental contamination in shellfish collected in Ponta Tinguá, Mangaratiba, RJ. To do so, the mussels collected were sent to the laboratory, where he initially suffered the shelling and then soaking manual. The macerate was diluted in distilled water and filtered resulting in a biomass-water solution that has been processed according to the technique of centrifugal formaldehyde-ether sedimentation. An aliquot of each sediment sample was placed between slide and coverslip for further evaluation in bright field microscopy, and

positive samples submitted to staining of safranin-methylene blue in order to confront the diagnosis. A total of 100 oocysts were measured as the parameters of larger diameter, smaller and morphometric index. We identified the presence of *Cryptosporidium* oocysts in all samples studied mussel biomass. The measurements of the oocysts were evaluated uniform distribution. However, despite this regularity, the similarity of the morphology of oocysts between the different species of the genus *Cryptosporidium* prevents the conclusion that only a single species was present in oocysts measured. However, it is characterized by the presence of *Cryptosporidium* in the biomass of mussels, environmental contamination, whether by human or animal waste, the study area.

KEY WORDS. *Cryptosporidium*, morphometry, mussels, environmental contamination.

*Recebido em...

Aceito em...

¹Nutricionista. *MSc. Food Technol.* Programa de Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niteroi, CEP 24230-340. E-mail: tatiana.cardozo@gmail.com

²Biólogo. *Dr. CsVs.* Escola de Ciências da Saúde, Curso de Especialização em Ciências do Laboratório Clínico e Diagnóstico *in vitro*, UNIGRANRIO, Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, RJ 25071-202, Brasil. E-mail: bertobp@gmail.com

³Médico-veterinário. *Dr. Pathol.* Escola de Ciências da Saúde, Curso de Especialização em Ciências do Laboratório Clínico e Diagnóstico *in vitro*, UNIGRANRIO, Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, RJ 25071-202, Brasil. E-mail: sergianvc@gmail.com

⁴Médica-veterinária. *Dr. Zool.* Departamento de Tecnologia de Alimentos, FV, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niteroi, 24230-340, RJ. E-mail: elianafmm@uol.com.br

⁵Médico-veterinário. PhD, LD, DPA, IV, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: lopeschw@ufrj.br – bolsista CNPq.

RESUMO. O despejo de esgoto sem tratamento ou tratado em rios e mares compromete a qualidade destes corpos hídricos, pois pode introduzir patógenos entéricos humanos ou animais e contribuir para a elevação dos níveis de nutrientes orgânicos nestas áreas. O objetivo do presente trabalho foi utilizar o gênero

Cryptosporidium como biomarcador de contaminação ambiental em moluscos bivalves coletados na Ponta do Tinguí, Mangaratiba, RJ. Para isso, os mexilhões coletados foram encaminhados ao laboratório, onde inicialmente sofreram a retirada das conchas e em seguida maceração manual em grau com o auxílio de um pistilo. O macerado foi diluído em água destilada e filtrado obtendo-se uma solução água-biomassa que foi processada de acordo com a técnica de centrifugo-sedimentação formaldeído-éter. Uma alíquota do sedimento de cada amostra foi colocada entre lâmina e lamínula para posterior avaliação em microscopia de campo brilhante, sendo as amostras positivas submetidas à técnica de coloração de safranina-azul de metileno, com o intuito de confrontar o diagnóstico. Um total de 100 oocistos foi mensurado quanto aos parâmetros de diâmetro maior, menor e índice morfométrico. Foi identificada a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em todas as amostras de biomassa de mexilhões estudadas. As medidas dos oocistos avaliados foram uniformes em sua distribuição. Porém, apesar desta regularidade, a similaridade da morfometria dos oocistos entre as diferentes espécies do gênero *Cryptosporidium* impede a conclusão de que apenas uma única espécie estivesse presente nos oocistos mensurados. Contudo, fica caracterizada através da presença de oocistos de *Cryptosporidium* na biomassa dos mexilhões, a contaminação ambiental, seja por dejetos humanos ou animais, da área estudada.

PALAVRAS-CHAVE. *Cryptosporidium*, morfometria, mexilhões, contaminação ambiental.

INTRODUÇÃO

A contaminação de águas dos rios, lagos e mares por esgoto urbano não tratado e dejetos industriais são responsáveis pela degradação dos recursos hídricos do Brasil e da maioria dos países do mundo (Valença 2003).

Os bivalves marinhos estão distribuídos ao longo do ambiente costeiro e, devido ao seu hábito alimentar filtrador, pode acumular grande número de bactérias, parasitos e metais pesados (Carvalho 2001, Leal & Franco 2008). Os mexilhões filtram 19 a 50 l

de água por hora, com pouca ou nenhuma capacidade seletiva (GALVÃO 2004). Em ostras, por exemplo, grande percentual das bactérias ingeridas sobrevive ao processo digestivo devido à adaptação ao ambiente marinho, aos mecanismos de resistência associados à degradação enzimática e ao uso do ambiente intestinal do hospedeiro como fonte nutricional por esses microrganismos (Silva et al. 2004).

Muitos surtos alimentares em humanos são decorrentes do consumo *in natura* de frutos do mar que, ingeridos sem o conveniente processamento térmico, podem levar microrganismos patogênicos ao trato gastrointestinal do homem (Crocì et al. 2002, Pereira et al. 2006). Os moluscos bivalves são os maiores acumuladores de poluentes do meio ambiente, destacando-se como bioindicadores da insalubridade da água (Leal & Franco 2008). Os principais testes realizados em moluscos para indicar a qualidade microbiológica das águas são a quantificação dos coliformes totais e termotolerantes (Sande et al. 2010), além dos testes parasitológicos para detecção e quantificação de protozoários, principalmente os do gênero *Cryptosporidium* e *Giardia*, que vem sendo preconizados crescentemente e apresentam resultados satisfatórios (Leal & Franco 2008, Cardozo et al. 2012).

Embora pesquisas sobre a presença de espécies do gênero *Cryptosporidium* e *Giardia*, na água marinha não sejam ainda tão freqüentes, mesmo em nível mundial, ambos os protozoários já foram detectados em praias e regiões estuarinas de alguns países, inclusive o Brasil (Johnson et al. 1995, Cardozo et al. 2012).

O objetivo do presente trabalho foi utilizar o gênero *Cryptosporidium* como biomarcador de contaminação ambiental em moluscos bivalves coletados na Ponta do Tinguí, Mangaratiba, RJ.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo se concentrou na região de Mangaratiba, onde foram coletados os mexilhões diretamente de bancos naturais localizados na Ponta do Tinguí, área pertencente a região costeira da própria Baía de Sepetiba.

A Baía de Sepetiba está localizada no litoral sudeste do estado do Rio de Janeiro abrangendo os municípios do Rio de Janeiro, Itaguaí e Mangaratiba. Esta baía funciona

como um sistema estuarino apresentando águas menos salinas e mais quentes durante a maré baixa na parte mais próxima a costa e águas mais frias e mais salinas em direção ao largo (Signorini 1980). Esta bacia hidrográfica drena municípios densamente povoados e sem infra-estrutura sanitária. Também abriga um parque industrial. Esses fatores fazem com que a baía de Sepetiba seja um local altamente impactado por poluição de efluentes domésticos (esgoto “*in natura*”) e químicos (metais pesados, óleo de embarcação).

A baía de Sepetiba juntamente com suas áreas de mangue e zonas estuarinas constitui um criadouro natural. Dado à sua condição bem abrigada ao longo da costa brasileira, e seu histórico de região marisqueira, a baía é naturalmente um local propício para o desenvolvimento de ostras, mexilhões, e sururus, camarões, e peixes, sendo a atividade pesqueira um importante suporte econômico e social para esta região.

Local de experimentação

As amostras de mexilhões (*Perna perna*) coletadas foram analisadas no Laboratório de Coccidios e Coccidioses (LCC) do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), vinculados ao Projeto Sanidade Animal (PSA-EMBRAPA/UFRRJ).

Processamento, mensuração e fotomicrografia dos oocistos

Após a chegada dos mexilhões no LCC, estes foram desconchados e a biomassa submetida ao processo de maceração manual em grau com o auxílio de um pistilo. Em seguida, o macerado foi diluído em água destilada e filtrado obtendo-se uma solução água-biomassa. Esta solução foi processada de acordo com a técnica de centrífugo-sedimentação formaldeído-éter (Richtie 1948). Uma alíquota do sedimento de cada amostra foi colocada entre lâmina e lamínula para posterior avaliação em microscopia de campo brilhante, sendo as amostras positivas submetidas à técnica de coloração de safranina-azul de metileno (Baxby et al. 1984), com o intuito de confrontar o diagnóstico.

A mensuração dos oocistos presentes na biomassa dos mexilhões foi feita com a utilização de uma lente ocular micrométrica K-15X-PZO (Polônia) acoplada ao

microscópio binocular Carl Zeiss (RFA) em objetivas de imersão (100X), onde se obtiveram as medidas dos diâmetros maior (DM) e menor (dm) em μm , e o índice morfométrico para 100 oocistos.

As fotomicrografias dos oocistos presentes nas amostras oriundas dos moluscos bivalves foram feitas com a utilização de uma câmera Evolution MP 5.0 Colled, RTV acoplada ao microscópio triocular Nikon Eclipse E200, utilizando o programa Image Pro-Plus 6.0, em objetiva de imersão 100x.

Análise estatística

As análises estatísticas para obtenção dos gráficos com os resíduos e do coeficiente de inclinação da reta de regressão linear foram realizadas de acordo com Sampaio (2002) utilizando o software Microsoft Excel 2000[®].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi identificada a presença de oocistos de *Cryptosporidium* (Figura 1) em todas as amostras de biomassa de mexilhões (*Perna perna*) estudadas. As medidas dos oocistos avaliados foram uniformes em sua distribuição. Observando os histogramas de DM e dm na figura 2, percebe-se que as freqüências nas classes aumentam e diminuem gradativamente, ou seja, as medidas dos oocistos apresentam-se em menor quantidade nos limites dos valores e em maior quantidade nos valores medianos, evidenciando apenas uma espécie. No histograma de índice morfométrico notou-se que as freqüências são maiores nas duas primeiras classes de valores inferiores e diminuem consideravelmente nas classes de valores superiores. Este resultado sustenta a alta tendência dos oocistos de *Cryptosporidium* possuírem forma esférica a subsférica, ou seja, índice morfométrico entre 1,0 a 1,1.

Além disso, na regressão linear o valor de R^2 foi próximo a 0,7 e, devido a isto, os pontos mantiveram-se próximos a reta de regressão no gráfico (Figura 3). Desta maneira, pode-se afirmar que poucas variações ocorreram de dm sobre DM, de modo que um padrão pôde ser estabelecido.

Estes resultados foram similares àqueles obtidos por Berto et al. (2008) e Ramirez et al. (2009). Entretanto, apesar desta regularidade, a similaridade da morfometria dos oocistos entre as diferentes espécies do gênero *Cryptosporidium*

impede a conclusão de que apenas uma única espécie estivesse presente nos oocistos mensurados. Contudo, fica caracterizada através da presença de oocistos de *Cryptosporidium* na biomassa dos mexilhões, a contaminação ambiental, seja por dejetos humanos ou animais, da área estudada.

Segundo Leal & Franco (2008) o local no qual ocorrem 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. Tais observações ratificam os resultados apresentados no presente estudo, uma vez que, os mexilhões contaminados por oocistos de *Cryptosporidium* são amplamente comercializados e consumidos pela população do entorno da Ponta do Tinguí, que vivem basicamente do extrativismo destes animais.

Surtos de doenças associadas ao consumo de moluscos bivalves têm sido 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 (Potasman et al. 2002). O maior surto já noticiado ocorreu em Xangai, na China, no ano de 1988, onde 290 mil pessoas contraíram o vírus da hepatite A após ingerir mariscos e 47 pessoas foram a óbito (Tang et al. 1991).

Contaminação de moluscos bivalves por protozoários patogênicos, atualmente, tem sido apresentado como um aspecto emergente e com fortes implicações em saúde pública. Embora até os dias de hoje não se tenha relatos da ocorrência de surtos de protozooses relacionados à ingestão de mariscos em todo o mundo, a ocorrência natural de *Cryptosporidium* já foi reportada em diversos países em diferentes espécies de moluscos bivalves (Leal & Franco 2008, Cardozo et al. 2012). 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 (Rose et al. 2002).

CONCLUSÃO

Tratando-se separadamente do aspecto sanitário em todo esse desenvolvimento, torna-se especialmente relevante e necessário o monitoramento parasitológico das espécies de moluscos bivalves que serão ofertadas 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baxby, D.; Blundell, N.; Hart, C.A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *J. Hyg.*,93: 317-323, 1984.
- Berto, B.P.; Cardozo, S.V.; Teixeira-Filho, W.L. ; Ferreira, A.M.R.; Lopes, C.W.G. Aflatoxin effect on the oocysts morphometry and contribution on the morphology of *Eimeria bateri* Bhatia, Pandey and Pande, 1965 of the Japanese quail *Coturnix japonica*, in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*,17: 235-238, 2008.
- Carvalho, C.E.V.; Cavalcante, M.P.O.; Gomes, M.P.; Faria, V.V.; Rezende, C.E. Distribuicao de metais pesados em mexilhoes (*Perna perna*, L.) da Ilha de Santana, Macae, SE, Brasil. *Ecotoxicol. Environ. Rest.*, 4: 1-5, 2001.
- Galvao, J.A. *Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões Perna perna (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP.* 2004. 109 f. Dissertacao (Mestrado em Ciencia e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004. (Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-16092004.../juliana.pdf>)
- 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. Panam. Infectol.*, 10: 48-57, 2008.
- Potasman, I., Paz, A., Odeh, M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin. Infect. Dis.*, 35: 921-928, 2002.

- Ramirez, L.; Teixeira-Filho, W.L.; Berto, B.P.; Balthazar, L.M.C.; Lopes, C.W.G. Caracterização de variações morfométricas com a utilização da regressão linear em espécies do gênero *Eimeria* em caprinos da região serrana do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 31: 175-180, 2009.
- Ritchie, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull. U.S. A. Med. Depart.*, v. 8, p. 326, 1948.
- Rose, JB, Huffman, D.E, Gennaccaro, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiol. Reviews*, 26:113-123, 2002.
- Sampaio, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte, Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. p.265.
- Silva, A.I.M.; Vieira, R.H.S.M.; Menezes, F.G.R.; Fonteles-Filho, A.A.; Torres, R.C.O.; Sant'anna, E.S. Bacteria of fecal origin in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Coco river estuary, Ceara State, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 35:126-130, 2004.
- 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 clam. *Epidemiol. Infect.*, 107: 651-657, 1991.
- Valença, J.F.S. *Rio Salgado: agente de agravos a saúde das populações ribeirinhas*. 2003. 109 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2003. (Disponível em: http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/drma/teses/dissertacao_joana.pdf)

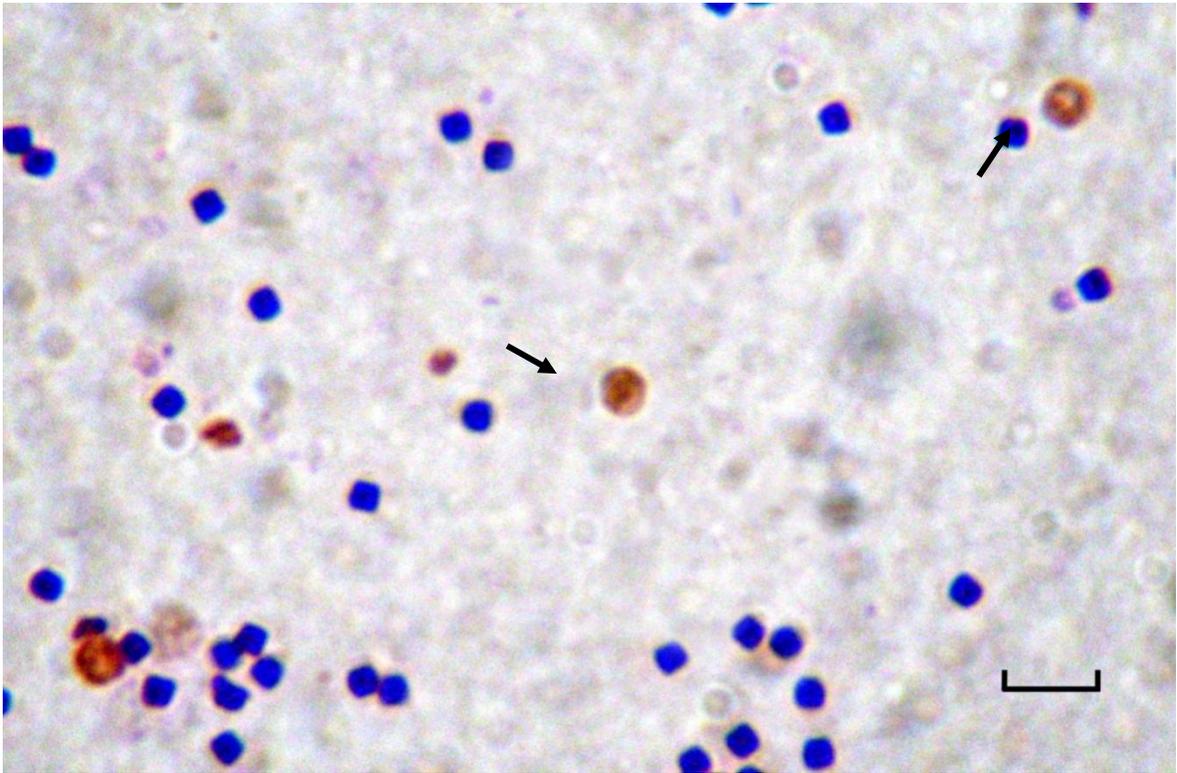


Figura 1. Oocisto de *Cryptosporidium* (→) obtido da biomassa de mexilhões (*Perna perna*). Safranina-azul de Metileno (= 10 μ m).

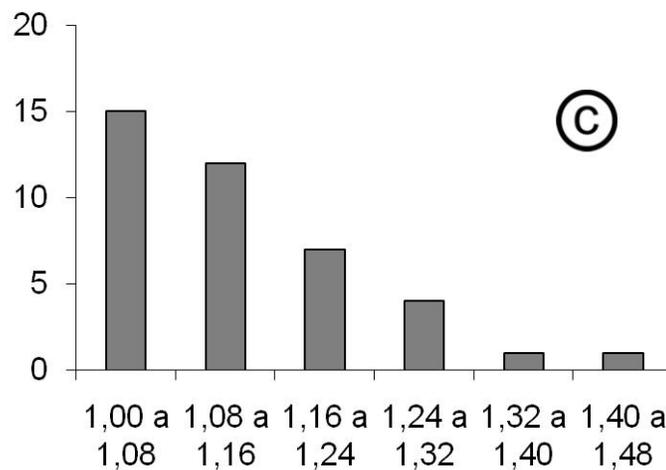
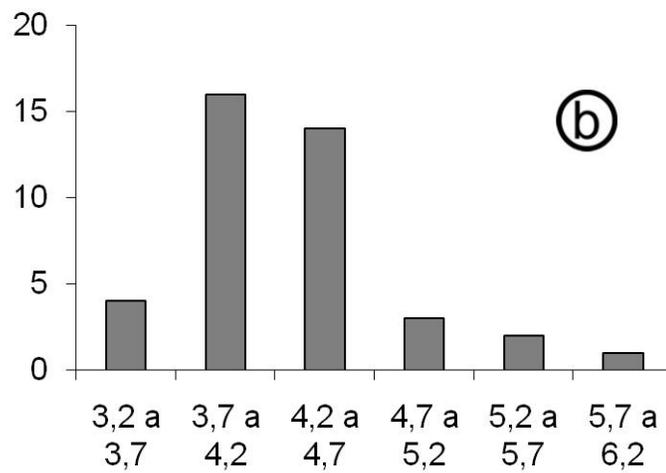
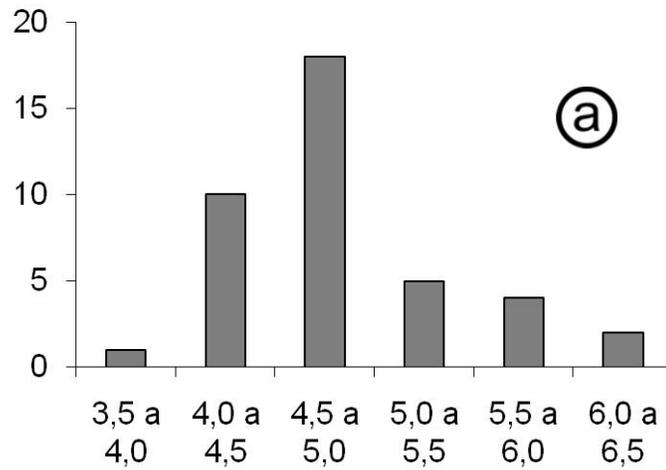


Figura 2. Histogramas de diâmetro maior (a), menor (b) e índice morfométrico (c) dos oocistos de *Cryptosporidium* recuperados da biomassa de mexilhões (*Perna perna*), na Ponta do Tinguí, Mangaratiba, RJ. Eixo Y: frequências; Eixo X: classes de medidas.

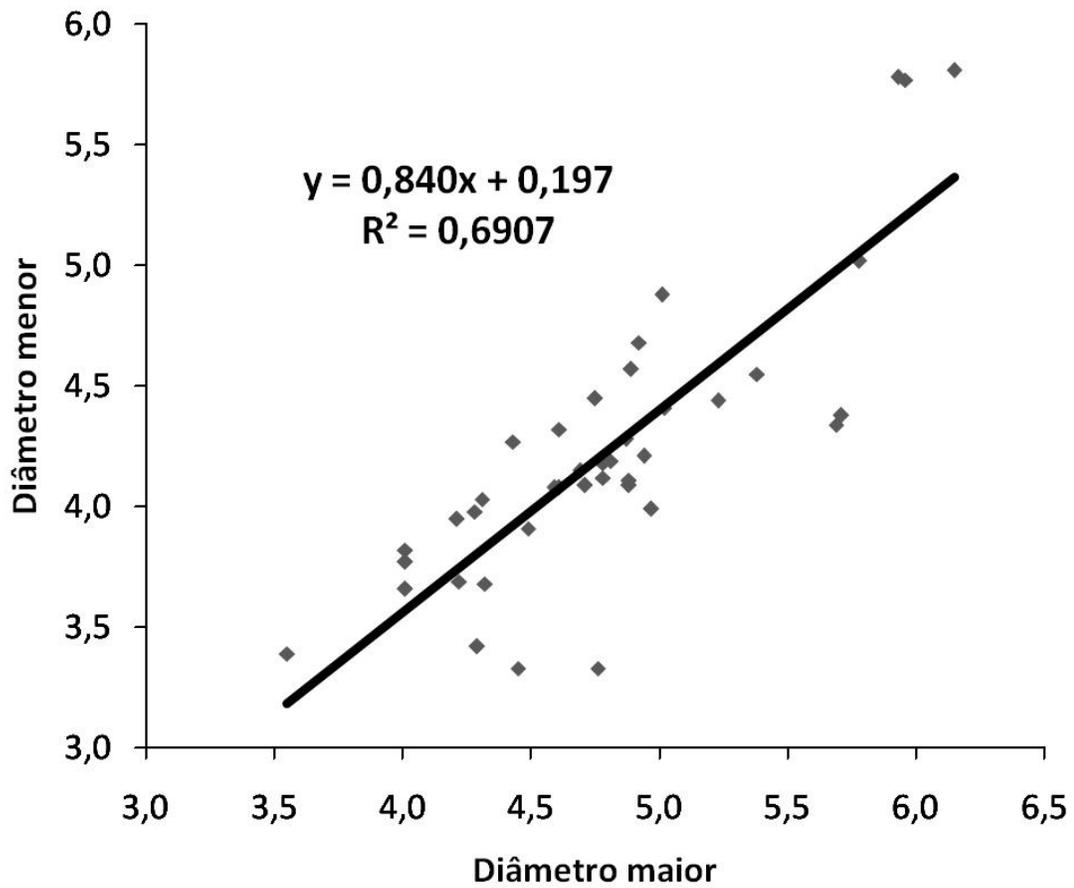


Figura 3. Regressão linear das medidas dos oocistos de *Cryptosporidium* recuperados da biomassa de mexilhões (*Perna perna*), na Ponta do Tinguí, Mangaratiba, RJ.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em todas as amostras da biomassa dos mexilhões (*P. perna*) processadas e submetidas a avaliação parasitológica foi observada a presença de oocistos de *Cryptosporidium* demonstrando que existe contaminação ambiental, seja por fezes humanas e/ou animais.

Foi verificada a correlação negativa entre os dados biométricos e parasitológicos observando que a contaminação ambiental presente na área estudada, esta diretamente relacionada com a taxa de crescimento dos mexilhões, uma vez que estes animais se alimentam por filtração, sendo esta realizada sem nenhuma capacidade seletiva. Mesmo estes animais tendo alto potencial de depuração dos sedimentos filtrados, caso a contaminação ambiental seja persistente, ocorre uma influência significativa no desenvolvimento desses mexilhões.

Tratando-se separadamente do aspecto sanitário em todo esse desenvolvimento, torna-se especialmente relevante e necessário o monitoramento parasitológico das espécies de moluscos bivalves que serão ofertadas 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.

Além da presença de oocistos de *Cryptosporidium*, nas amostras de biomassa dos mexilhões estudados também foi observado a presença de arranjos morfológicos bacterianos característicos do gênero *Sarcina*. Tal achado ratifica a presença de contaminação ambiental por dejetos humanos e/ou animais na área estudada, uma vez

que, este gênero bacteriano, assim como *Cryptosporidium* podem ser encontrados nas fezes de várias espécies de vertebrados, inclusive nas do homem.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, R.T. *Kingdon of seashell*. Melbourne: American Malacologists. 1993, 256 p.

ANDERSON, B. C. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 178, n. 9, p. 892-984, 1981.

ANDERSON, B. C.; DONNDELINGER, T.; WILKINGS, R. M.; SMITH, J. Cryptosporidiosis in a veterinary student. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 180, n. 4, p. 408-409, 1982.

ANDERSON, B.C. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.178, n,9, p.892-984, 1981.

APPELBEE AJ, THOMPSON RCA, OLSON ME. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife. The current status and future needs. *Trends in Parasitology*, v. 21, p. 370-376, 2005.

ARAÚJO, F.G.; CRUZ-FILHO, A.G.; AZEVÊDO, M.C.C.; SANTOS, A.C.A. Estrutura da comunidade de peixes demersais da baía de sepetiba, RJ. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 58, n.3, p. 417-430, 1998.

ASSUMPÇÃO, A. *Estudo da viabilidade de criação de cooperativas dos produtores de mexilhão do litoral norte paulista*. Piracicaba, ESALQ, Departamento de Economia, Administração e Sociologia, 1999. 40p. (Relatório CES, 629).

AWAD-EL-KARIEM, F. M.; WARHUST, D. C.; MCDONALD, V. Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based PCR and endonuclease digestion. *Parasitology*, v. 109, n. 1, p. 19-22, 1994.

BARARDI, C. R. M.; SANTOS, C. S. dos; SIMÕES, C. M. O. Ostras de qualidade em Santa Catarina. *Ciência hoje*, v. 29, n. 172, p. 70-73, 2001.

BAXBY, D.; BLUNDELL, N.; HART, C. A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *Journal of Hygiene*, v. 93, n. 2, p. 317-323, 1984.

BEGNESCU, S. D. Application de la méthode de coloration Ziehl-Neelsen modifiée sur des sections histologiques dans le diagnostic de la cryptosporidiose. *Archives de Veterinaire*, v. 18, n. 1, p. 67-71, 1987.

BERTO, B.P.; CARDOZO, S.V.; TEIXEIRA-FILHO, W.L.; FERREIRA, A.M.R.; LOPES, C.W.G. Aflatoxin effect on the oocysts morphometry and contribution on the morphology of *Eimeria bateri* Bhatia, Pandey and Pande, 1965 of the Japanese quail *Coturnix japonica*, in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, p. 235-238, 2008.

BIRD, R. G.; SMITH, M. D. Cryptosporidiosis in man: parasite life cycle and fine structural pathology. *Journal of Pathology*, v. 132, n. 3, p. 217-233, 1980.

BIRD, R. G.; SMITH, M. D. Cryptosporidiosis in man: parasite life cycle and fine structural pathology. *Journal of Pathology*, v. 132, n. 3, p. 217-233, 1980.

BOFFI, A.V.. *Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico*. São Paulo, Fapesp, Ed. Hucitec, 112p., 1979.

BOMFIM, T. C. B. do. *Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907 (*Apicomplexa: Cryptosporidiidae*) em suínos: identificação, diagnóstico e alguns aspectos epidemiológicos. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Itaguaí, 1989. 113 p.

CACCIÓ SM, THOMPSON RCA, MCLAUCHLIN J, SMITH HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, v. 21, p. 430-436, 2005.

CAMPBELL, I.; TZIPORI, A.S.; HUTCHISON, G.; ANGUS, K.W. Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. *Veterinary Record*, v. 111, n. 18, p. 414-415, 1982.

CARMO, T.M.S.; COSTA, M.B.; SIQUEIRA, H.P. Determinação do valor nutritivo da carne de mexilhões, *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). Estudos sobre o teor de proteínas, lípidos, glicogênio e água. *Resumos...* In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, v. 36, p. 750, 1984.

CARVALHO, C.E.V.; CAVALCANTE, M.P.O.; GOMES, M.P.; FARIA, V.V.; REZENDE, C.E. Distribuição de metais pesados em mexilhões (*Perna perna*, L.) da Ilha de Santana, Macaé, SE, Brasil. *Ecotoxicology Environmental Rest*, v. 4, n.1, p. 1-5, 2001.

CDC Summary of Notifiable Diseases – United States, 1998, *MMWR Morb, Mortal. Weekly Report*, v. 47, p. 1-92, 1999.

CHAMPLIAUD, D.; GOBET, P.; NACIRI, M.; VAGNER, O.; LOPEZ, J.; BUISSON, J. C.; VARGA, I.; HARLY, G.; MANCASSOLA, R.; BONNIN, A. Failure to differentiate *Cryptosporidium parvum* from *C. meleagridis* based on PCR amplification of eight DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 4, p. 1454-1458, 1998.

- CHERMETTE, R.; BOUFASSA-OUZROUT, S. *Cryptosporidiosis: a cosmopolitan disease in animals and in man*. 2. ed. Paris: OIE, 1988, 122p.
- COELHO, V. M. B.; CARVALHO, R. R., 1973, Levantamento sanitário da Baía de Sepetiba e suas possibilidades como corpo receptor de cargas poluidoras da Região. *Publicações Avulsas FEEMA*, Rio de Janeiro, 87p.
- COOK, D.W. Microbiology of bivalves molluscan shellfish. In: Ward, D.R.; Hackney, C. *Microbiology of marine food products*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. Cap.2, p. 19-34.
- CORLISS, J. O. An interim utilitarian hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozoologica*, v. 33, n. 1, p. 1-51, 1994.
- COSTA, R. N. L. T. R., 1992, *Pensar o mar para poder pescar: o espaço da pesca de litoral na Baía de Sepetiba, RJ*. Dissertação (Mestrado Curso de Pós-Graduação em Geografia). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 181p.
- CURRENT, W. L. Cryptosporidiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 187, n. 12, p. 1334-1338, 1985.
- CURRENT, W. L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: Dubey, J. P., Speer, C. A., Fayer, R. (Eds.), *Cryptosporidiosis of man and animals*. Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 59-82.
- CURRENT, W. L.; GARCIA, L. S. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Review*, v.4, n. 3, p. 325-358, 1991.
- CURRENT, W. L.; REESE, N. C. A comparison of endogenous development of three isolates *Cryptosporidium* in suckling mice. *Journal of Protozoology*, v. 33, n. 1, p. 98-108, 1986.
- CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; HAYNES, T. B. The life cycle *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting chickens. *Journal of Protozoology*, v. 33, n. 2, p. 289-296, 1986.
- CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; HAYNES, T. B. The life cycle *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting chickens. *Journal of Protozoology*, v. 33, n. 2, p. 289-296, 1986.
- FAYER, R.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in Parasitology*, v. 20, p. 531-536, 2004.
- FAYER R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, v. 126, p. 37-56, 2004

FAYER, R.; LEEK, R. G. The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*. *Journal of Protozoology*, v. 31, n. 4, p. 567-569, 1984.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, v.30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000.

FAYER, R.; TROUT, J. M.; XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LAL, A. A.; DUBEY, J. P. *Cryptosporidium canis* sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology*, v. 87, n. 6, p. 1415-1422, 2001.

FAYER, R.; UNGAR, B. L. P. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological Review*, v. 50, n. 4, p.458-483, 1986.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. Cultivo de mexilhões. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E.; BETHAME, E. (org.). *Aquicultura Experiências Brasileiras*. Florianópolis: Editora Multitarefa. 2003, p. 221-264.

FLETCHER, O. J.; MUNNELL, J. F.; PAGE, R. K. Cryptosporidiosis of the bursa of Fabricius of chickens. *Avian Disease*. v. 19, n. 3, p. 630-639, 1975.

FRANCO, R. M. B. Protozoários patogênicos de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. *Revista Panamericana de Infectologia*, v. 9, n. 4p. 36-43, 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, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.42, n.2, p. 109-111, 2001.

FURLAN, E.F. *Vida útil dos mexilhões Perna perna cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos*. 2004, 106p. Dissertação (Mestrado) – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004. (Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-23112004-164608/pt-br.php>>).

GALVÃO, J.A. *Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões Perna perna (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP*. 2004. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004. (Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-16092004.../juliana.pdf>)

GALVÃO, J.A.; FURLAN, E.F.; SALÁN, E.O.; PORTO, E.; OETTERER, M. Características físico-química e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da água e dos mexilhões cultivados na região de Ubatuba, SP. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 30, p. 1124-1129, 2006.

GOODWIN, M. A. Cryptosporidiosis in birds: a review. *Avian Pathology*, v. 18, p. 365-384, 1989.

GOODWIN, M. A.; BROWN, J. Histologic incidence and distribution of *Cryptosporidium* sp. infection in chickens: 68 cases in 1986. *Avian Disease*, v. 32, n. 2, p. 365-369, 1988.

GOTTING, K.J. *Malakozologie*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 1974, 320p.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R. Experimental transmission of *Cryptosporidium* oocysts isolates from mammals, birds and reptiles to captive snakes. *Veterinary Research*, v. 29, n. 2, p. 187-195, 1998.

HELM, M. M.; BOURNE, N.; LOVATELLI, A. *Cultivo de Bivalvos em Criadero – Un manual práctico*. FAO Documento Técnico de Pesca, n. 471. Roma: FAO, 2004. 177 p.

HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 22, n. 3-4, p. 594-596, 1981.

HENRIQUES, M.B. *Resistência do mexilhão Perna perna (LINNAEUS, 1758) proveniente de bancos naturais da baixada santista, a variações de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo*. Rio Claro, 2004, 113f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 2004.

HOJLYNG, N.; HOLTEN-ANDERSON, W; JEPSEN, S. Cryptosporidiosis: a case of airborne transmission. *Lancet*, v.2, n. 8553, p. 271-272, 1987.

HOODA, P. S.; EDWARDS, A. C.; ANDERSON, H. A.; MILLER, A. A review of water quality concerns in livestock farming areas. *Science Total Environmental*, v. 250, n. 1-3, p. 143-167, 2000.

HOOVER, D. M.; HOERR, F. J.; CARLTON, W. W. et al. Enteric cryptosporidiosis in a naso tang (*Naso literatus*, Bloch and Schneider). *Journal of Fish Disease*, v. 4, p. 425-428, 1981.

ITAKURA, C.; NAKAMURA, H.; UMEMURA, T. et al. Ultrastructure of cryptosporidial life cycle in chicken host cells. *Avian Pathology*, v. 14, p. 237-249, 1985.

KIRKPATRICK, C. E.; FARREL, J. P. Cryptosporidiosis. *Compendium of the Continuing Education. Practice of Veterinary*, v. 6, p. 154-165, 1984.

KLAPPENBACH, M.A.. Lista preliminar de los Mytilidae brasileños con claves paradedeterminación y notas sobre su distribución. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 37, p. 327-352, 1965.

KRAMER, M. H.; SORHAGE, F. E.; GOLDSTEIN, S. T.; DALLEY, E.; WAHLQUIST, S. P.; HERWALDT, B. L. First reported outbreak in the United States of cryptosporidiosis

associated with a recreational lake. *Clinical Infectious Disease*, v.26, n. 2, p.27-33, 1998.

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. *Revista Panamericana de Infectologia*, v. 10, p. 48-57, 2008.

LECHAVALLIER, M. W.; NORTON, W. D.; LEE, R. G. Giardia and *Cryptosporidium* spp. in filtered water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, p.2617-2621, 1991.

LENG, X.; MOSIER, D. A.; OBERST, R. D. Differentiation of *Cryptosporidium parvum*, *C. muris* and *C. baileyi* by PCR-RFLP analysis of the 18s rRNA gene. *Veterinary Parasitology*, v. 62, n, 1-2, p. 1-7, 1996.

LEVINE, N.D. Some corrections of coccidium (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *Journal of Parasitology*, v. 66, n. 5, p. 830-834, 1980.

LINDNER, G.. *Moluscos y caracoles de los mares del mundo. Aspecto/Distribución/Sistemática*. Tercera edición. Barcelona: Ed. Omega, S.A., (1989), 236p.

LIRA, A.A.; BARROS, G.C.; LIMA, M.C.G.; MOTA, R.A. Aspectos sanitários do ambiente aquáticos onde são capturados moluscos bivalves para consumo no Grande Recife, P.E. *Revista Higiene Alimentar*, v. 11, n.77, p.53-57, 2000.

LUNETTA, J.E.. Fisiologia da reprodução dos mexilhões (*Mytilus perna* – Mollusca Lamellibranchia) Boletim da Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade de São Paulo, v. 26, p. 33-111, 1969.

MACKENZIE, W. R.; SCHELL, W. L.; BLAIR, K. A.; ADDISS, D. G.; PETERSON, D. E.; HOXIE, N. J.; KAZMIEREZAK, J. J.; DAVIS, J. P. Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clinical of Infectious Disease*, v. 21, n. 1, p. 57-62, 1995.

MAGALHÃES, A.R.M. *Teor de proteínas do mexilhão Perna perna (Linné, 1758) (Mollusca, Bivalvia) em função do ciclo sexual*. São Paulo, 1985, 177p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Animal) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1985.

MARCIAL, M. A.; MADARA, J. L. *Cryptosporidium*: cellular localization, structural analysis of absorptive cell-parasite membrane-membrane interactions in Guinea pigs, and suggestion of protozoan transport by M cells. *Gastroenterology*, v. 90, n. 3, p. 583-594, 1986.

MARQUES, H.L.A. *Criação comercial de mexilhões*. São Paulo, Nobel, 1998. 111p.

MARQUES, H.L.A.. *Considerações ecológicas sobre o mexilhão Perna perna (Linnaeus, 1758) em bancos naturais da região de Ubatuba, São Paulo, Brasil*.

Campinas, Dissertação (Mestrado em Ecologia), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, (1988), 108p.

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. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 11, p. 3984-3990, 2000.

MEISEL, J. L.; PERERA, D. R.; MELIGRO, C. et al. Overwhelming diarrhoea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, v. 70, n. 6, p. 1156-1160, 1976.

MELANCON, M. J. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In: Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton Junior, G. A.; Cairns Junior, J. (Eds). *Handbook of ecotoxicology*. New York, Lewis Publishers, 1995. c. 11, p. 220-240.

MEUTEM, D. J.; VAN KRUIJNINGEN, H. L.; LEIN, D. H. Cryptosporidiosis in a calf. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 165, p. 914-917, 1974.

MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. PCR detection of *Cryptosporidium*: The way forward? *Parasitology Today*, v. 14, p. 241-245, 1998.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; LIMOR, J.; GELIS, S.; RAIDAL, S.; FAYER, R.; LAL, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-necked parrot (*Psittacula krameri*). *Australian Veterinary Journal*, v. 78, p.182-183, 2000.

MORGAN, U. M.; FALL, A.; WARD, L. A.; HIJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A.; OSLON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 49, n. 6, p. 433-440, 2002.

MOSIER, D. A.; OBERST, R.D. Cryptosporidiosis. A global challenge, *Annals of the New York Academy of Science*, v. 916, p. 102-111, 2000.

MTAMBO, M. M.; NASH, A. S.; BLEWETT, D. A.; SMITH, H. V.; WRIGHT, S. *Cryptosporidium* infection in cats: prevalence of infection in domestic and feral cats in the Glasgow area. *Veterinary Record*, v.129, n. 23, p.502-504, 1991.

MUJIKA M., CALVO M., LUCENA F.; GIRONES R. Comparative analysis of pathogens and potential indicators in shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, n. 83, p. 75-85. Elsevier Science Ltd, 2003.

NICHOLS, G.; THOM, B. T. Screening for *Cryptosporidium* in stools. *Lancet*, v. 323, n. 8379, p. 734-735, 1984.

NIME, F. A. et al. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, v. 70, n. 4, p. 592-598, 1976.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, v. 25, p. 139-195, 1995.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* infection in man, animals, birds and fish. *Australian Veterinary Journal*, v. 62, p. 253-258, 1985.

O'DONOGHUE, P. J.; THAM, V. L.; DE SARAM, W. G.; PAULL, K. L.; MCDERMOTT, S. *Cryptosporidium* infections of birds and mammals and attempted cross-transmission studies. *Veterinary Parasitology*, v. 26, n. 1-2, p. 1-11, 1987.

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. *Journal of Infectious Diseases*, v. 180, p. 1275-1281, 1999.

OLIVEIRA, G.M. *Presença de dinoflagelados bentônicos potencialmente tóxicos: Identificação do perigo em áreas destinadas à maricultura na Baía de Sepetiba*, RJ. Seropédica, 2009. 129p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

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. Tese. Universidade Estadual de Campinas; 2005. 100p.

PADUA, H.B. de. *Informações sobre os coliformes totais/fecais e alguns outros organismos indicadores em sistemas aquáticos: aquicultura*, 2003. 20p. Disponível em: <<http://www.setorpesqueiro.com.br>>. Acesso em: 12 ago. 2003.

PANCIERA, R. J.; THOMASSEN, R. W.; GARNER, F. M. *Cryptosporidium* infection in a calf. *Veterinary Pathology*, v. 8, p. 479-484, 1971.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Remedia-Klinicka Mikrobiologie*, v. 3, p. 290-301, 1999.

PEREIRA, S. J.; RAMIREZ, N. E.; XIAO, L.; WARD, L. A. Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *Journal of Infectious Diseases*, v. 186, n. 5, p. 715-718, 2002

POHJOLA, S.; NEUVONEN, E.; NISKANEN, A. et al. Rapid immunoassay for detection of *Cryptosporidium* oocysts. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 27, n. 1, p. 71-79, 1986.

POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clinical Infectious Diseases*, 35: 921-928, 2002.

PROCTOR, J. S.; KEMP, R.L. *Cryptosporidium anserinum* sp. n. (sporozoa) in a domestic goose *Anser anser* L., from Iowa. *Journal of Protozoology*, v. 21, n. 5, p. 654-666, 1974.

QUAYLE D.B.; NEWKIRK G.F. Farming bivalve molluscs methods for study and development. In: Sandifer P.A. *Advances in world aquaculture*. Montreal, The World Aquaculture Society, 1989. v.1, 249p.

QUIROZ, E. S.; BERN, C.; MACARTHUR, J. R.; XIAO, L.; FLETCHER, M.; ARROWOOD, M. J.; SHAY, D. K.; LEVY, M. E.; GLASS, R. I.; LAL, A. An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler. *Journal of Infectious Diseases*, v. 181, n. 2, p. 695-700, 2000.

RAMIREZ, L; TEIXEIRA-FILHO, W.L.; BERTO, B.P.; BALTHAZAR, L.M.C.; LOPES, C.W.G. Caracterização de variações morfométricas com a utilização da regressão linear em espécies do gênero *Eimeria* em caprinos da região serrana do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 31: 175-180, 2009.

REGAN, P. M.; MARGOLIN, A. B.; WATKINS, W. D. Evaluation of microbial indicators for the determination of the sanitary quality and safety of shellfish. *Journal of Shellfish Research*, v. 12, n. 1, p. 95-100. 1993.

RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull. U.S. A. Medical Department*, v. 8, p. 326, 1948.

RODRIGUES, P. F. *Caracterização sanitária de áreas de criação de moluscos bilvalgos do litoral norte do Estado de São Paulo*. São Paulo, 1998. 66p. Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

ROSE, J. B.; HUFFMAN, D.E.; GENNACCARO, A. Risk and control of water borne cryptosporidiosis. *FEMS. Microbiology Reviews*, 26: 113–123, 2002.

RYAN, U. M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, I. M.; MONIS, P.; LAL, A. A.; FAYER, R.; PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Parasitology*, v. 89, n. 4, p. 809-813, 2003.

RYAN, U.M.; MONIS, P.; ENEMARK, H. L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDDLE, R.; ROBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R. C.; XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology*, v. 90, n. 4, p. 769-73, 2004.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte, Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. p.265.

SARGENT, K. D.; MORGAN, U. M.; ELLIOT, A. D.; THOMPSON, R. C. A. Morphological and genetic characterization of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. *Veterinary Parasitology*, v. 77, n. 4, p. 221-227, 1998.

- SILVA, A.I.M.; VIEIRA, R.H.S.M.; MENEZES, F.G.R.; FONTELES-FILHO, A.A.; TORRES, R.C.O.; SANT'ANNA, E.S. Bacteria of fecal origin in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Coco river estuary, Ceara State, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35:126-130, 2004.
- SIMPSON, V. R. Wild animals as reservoirs of infectious diseases. *Veterinary Journal*, v. 163, n. 2, p. 128 – 146, 2002.
- SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*, v.65, n. 3, p. 262-266, 1955.
- SRÉTER, T.; HORNOK, S.; VARGA, I.; BÉKÉSI, L.; SZÉLL, Z. Attempts to immunize chickens against *Cryptosporidium baileyi* with *C. parvum* oocysts and Paracox vaccine. *Folia Parasitologica*, v. 44, n. 1, p. 77-80, 1997.
- STERLING, C. R.; SEEGAR, K.; SINCLAIR, N. A. *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*, v. 153, n. 2, p. 380-381, 1986.
- STIBBS, H. H.; ONGERTH, J. E. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 24, n. 4, p. 517-521, 1986.
- STIX, H., STIX, M. & ABBOTT, R.T. *The shell: gift of the sea*. New York: Abrams, (1984), 163 p.
- SUNDERMANN, C. A.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. In vitro excystation of *Cryptosporidium baileyi* from chickens. *Journal of Protozoology*, v. 34, n. 1, p. 28-30, 1987.
- 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 clam. *Epidemiology and Infection*, 107: 651-657, 1991.
- TYZZER, E. E. Coccidiosis in gallinaceous birds. *American Journal of Hygiene*, v.10, p. 269-383, 1929.
- TYZZER, E. E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archive fur Protistenkunde*, v. 26, p.394-412, 1912.
- TZIPORI S, WARD H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 1047-1058, 2002. .
- TZIPORI, S. Cryptosporidiosi in animals and humans. *Microbiological Reviews*, v. 47, n. 1, p. 84-96, 1983.
- TZIPORI, S. Cryptosporidiosis: Laboratory investigations and chemotherapy. *Advance in Parasitology*, v. 40, p. 187-221, 1998.

VALENÇA, J.F.S. *Rio Salgado: agente de agravos a saúde das populações ribeirinhas*. 2003. 109 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2003. (Disponível em: http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/mdrma/teses/dissertacao_joana.pdf)

WASSERMAN, J.C. O Impacto da mobilização química de metais durante um serviço de dragagem na Baía de Sepetiba para o terminal marítimo da CSA. Mobilidade de metais em Sepetiba, 2005, 83p.

WEBSTER, K. A. Molecular methods for the detection and classification of *Cryptosporidium*. *Parasitology Today*, v. 9, n. 7, p. 263-266, 1993.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C.; LAL, A. A. *Cryptosporidium* systematics and implications for the public health. *Parasitology Today*, v. 16, n. 7, p. 287-292, 2000.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R. C. A.; FAYER, R.; LAL, A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied in Environmental Microbiology*, v. 65, n. 8, p. 3386-3391, 1999.