

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

**Estudo de Mexilhões *Perna perna* (Linnè, 1858) diagnosticados
com *Cryptosporidium* spp. destinados ao consumo humano
indicando contaminação ambiental**

Geisi Ferreira Mariné

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Estudo de Mexilhões *Perna perna* (Linnè, 1858) diagnosticados
com *Cryptosporidium* spp. destinados ao consumo humano
indicando contaminação ambiental**

GEISI FERREIRA MARINÉ

Sob a Orientação da Professora
Teresa Cristina Bergamo do Bomfim

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ

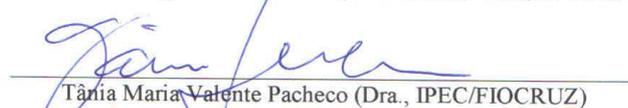
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

GEISI FERREIRA MARINÉ

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em
Parasitologia Animal.

TESE APROVADA EM 27/03/2012


Teresa Cristina Bergamo do Bomfim (Orientadora – Dra., DPA/UFRRJ)


Tânia Maria Valente Pacheco (Dra., IPEC/FIOCRUZ)


Pedro Paulo de Oliveira Silva (Dr., DTA – IT/UFRRJ)


Marcelo Vasconcelos Meireles (Dr., DCCRA/UNESP)


Beatriz Brener de Figueiredo (Dra., CMB – CCM/UFF)

DEDICATÓRIA

*À Deus, ao muito mais que marido Murilo,
a nossa nova razão de viver,
nosso filho Guilherme.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo cuidado em todo o tempo, por mais uma dentre tantas realizações concedidas. “Eis que Deus é o meu ajudador, o Senhor é quem me sustenta a vida” (Salmos 54:4).

Ao meu amado marido Murilo, por acreditar e me incentivar sempre, além de ser meu alicerce.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio e torcida.

À professora Teresa Cristina Bergamo do Bomfim pela orientação.

Ao funcionário Ivan por me levar a todas as coletas sendo mais do que motorista.

Ao mergulhador Moacir pela ajuda nas primeiras coletas.

Ao pescador Lúcio pelo transporte aos locais de coleta e pelos mergulhos para a obtenção dos mexilhões.

Ao prof. Marcelo de Freitas Lima pela contribuição intelectual de fundamental importância para a conclusão deste trabalho.

Ao colega e agora prof. Huarrison Azevedo Santos por todo o auxílio para a realização deste trabalho.

Aos técnicos e colegas de laboratório por onde passei grande parte destes últimos dois anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pelo financiamento.

RESUMO

MARINÉ, Geisi Ferreira. Estudo de Mexilhões *Perna perna* diagnosticados com *Cryptosporidium* spp. destinados ao consumo humano indicando contaminação ambiental. 2012. 101 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O gênero *Cryptosporidium* possui espécies capazes de infectar vários hospedeiros animais, tanto domésticos quanto silvestres e também o homem, sendo a única forma de transmissão a ingestão de oocistos, que pode ocorrer através da água e alimentos contaminados. Fontes de contaminação tais como a drenagem hídrica das fezes de animais, o uso de fertilizantes orgânicos e o lançamento de esgotos parcialmente ou não tratados favorecem a contaminação de vários ambientes aquáticos por este protozoário já que os oocistos são eliminados nas fezes dos hospedeiros. Nos mares a presença de *Cryptosporidium* spp. compromete a qualidade do pescado, como por exemplo mexilhões *Perna perna* presentes na costa brasileira. O trabalho teve como objetivos: diagnosticar e caracterizar geneticamente a(s) espécie(s) e/ou genótipo(s) de *Cryptosporidium* em mexilhões *Perna perna* extraídos de costões rochosos de duas localidades, Lage Preta e Praia do Saco, no Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro; realizar o seqüenciamento e análises filogenéticas, incluindo o depósito das seqüências de *Cryptosporidium* no GenBank; correlacionar a presença do protozoário com o índice de precipitação pluviométrica da região e estabelecer possíveis riscos da ingestão dos mexilhões, através da identificação de genótipo(s) e/ou espécie(s) com potencial zoonótico. Foram realizadas coletas mensais de março de 2009 a fevereiro de 2010, totalizando 12 coletas. A cada coleta foram separados 30 animais de cada local e divididos em três grupos com 10 animais cada, totalizando 72 amostras. Para as análises, o DNA extraído dos tecidos dos mexilhões foi utilizado na amplificação das seqüências do *18SSU rRNA* através da técnica Nested-PCR. Para a identificação de espécies os amplicons foram seqüenciados. Durante todos os meses estudados foi possível diagnosticar amostras de mexilhões *Perna perna* positivas para *Cryptosporidium* de pelo menos um dos locais estudados. Foi possível a identificação de três espécies *C. andersoni*, *C. meleagridis* e *C. parvum* nas amostras obtidas de mexilhões dos dois locais, através da observação de similaridades quando comparadas às seqüências já existentes no GenBank. A análise estatística mostrou que não houve influência da chuva ou da falta desta sobre a positividade das amostras de mexilhões para *Cryptosporidium*, de ambos os locais. Com os resultados obtidos, conclui-se que há probabilidade de contaminação humana através da ingestão de mexilhões provenientes da região estudada.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*, mexilhão *Perna perna*, diagnóstico molecular, filogenia, epidemiologia.

ABSTRACT

MARINÉ, Geisi Ferreira. Study Mussels *Perna perna* diagnosed with *Cryptosporidium* spp. intended for human consumption indicating environmental contamination. 2012. 101p Thesis (Ph.D. in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Institute of Veterinary, Department of Veterinary Parasitology, Universidad Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The *Cryptosporidium* genus has species capable of infecting various host animals, both domestic and wild as well as man, and the only way to transmit the infective oocysts intake, which can occur through the contaminated food and water. Sources of contamination such as water drainage of the animal faeces, the use of organic fertilizers and the release of part or untreated sewage contamination favor of various aquatic environments by this parasite since the oocysts are eliminated in the feces of the host. In the seas the presence of *Cryptosporidium* spp. directly affects the quality of fish such as mussels present in the Brazilian coast and is therefore limiting the consumption of food. The study aimed to: diagnose and characterize genetically type (s) and / or genotype (s) of *Cryptosporidium* in mussels taken from rocky shores at two locations, Lage Preta and Saco's Beach, in the Mangaratiba city, State of Rio de Janeiro, performing the sequencing and phylogenetic analyzes, including the deposit of *Cryptosporidium* sequences from GenBank, to correlate the presence of the parasite with the index of rainfall in the region and to establish possible risks of eating mussels, by identifying the genotype (s) and / or specie (s) with zoonotic potential. Were collected monthly from March 2009 to February 2010 totaling 12 samples. During data collection, 30 animals were separated from each location and divided into three groups of 10 animals each, totaling 72 samples. For the analyzes, the DNA extracted from tissues of mussels was used in the amplification of sequences *18SSU rRNA* by nested-PCR technique. For species identification, the amplicons were sent for sequencing. During all the study samples was possible to diagnose mussels *Cryptosporidium* positive for at least one of the study sites. It was possible to identify three species *C. andersoni*, *C. meleagridis* and *C. parvum* in samples obtained from two locations of mussels, by observing the similarity when compared to existing sequences in GenBank. It is possible the occurrence of human cryptosporidiosis by the consumption of mussels, raw or partially cooked, from the city of Mangaratiba. Statistical analysis showed no influence of rain in positivity of the samples of mussels for *Cryptosporidium*. With these results we conclude that there is likelihood of human exposure through ingestion of mussels from the region studied.

Key Word: *Cryptosporidium*, mussels, molecular diagnosis, phylogeny and epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Gráfico de Tendências da produção aquícola mundial - Principais grupos de espécies (1970 – 2008) (Adaptado de EL ESTADO MUNDIAL DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA, Departamento de pesca y Acuicultura de La FAO, Roma, 2010). 3
- Figura 2:** Aspecto geral da anatomia e organização interna do mexilhão (Adaptado: Série Manuais BMLP de maricultura, Cultivo de Mexilhões; Brazilian Mariculture Linkage Program – Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura, p. 6, 2003)..... 7
- Figura 3:** Imagem do ciclo biológico de *Cryptosporidium parvum*, demonstrando todas as fases endógenas no epitélio intestinal (CHEN et al., 2002). 16
- Figura 4:** Imagem de satélite do Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro, indicando os locais de coleta. Local A- Laje Preta; Local B - praia do Saco..... 38
- Figura 5:** Local A – Laje Preta – Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. 39
- Figura 6:** Imagem de satélite indicando a proximidade do local B, com o rio do Saco desaguando no mar. A esquerda observa-se elevada densidade demográfica. Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. 40
- Figura 7:** Local B – Praia do Saco – Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro.. 40
- Figura 8:** Mexilhões *Perna perna* em tamanho de abate separados no laboratório, medindo em média 6 cm..... 41
- Figura 9:** Organograma indicando a formação das amostras dos locais A e B..... 42
- Figura 10:** Imagem dos moluscos selecionados, após a retirada das valvas: A - 30 animais sem as valvas; B – mexilhão isolado para dissecação e C – separação parcial da glândula digestiva e brânquias. 43
- Figura 11:** Amplificação pela Nested-PCR do gene *18SSU rRNA* de *Cryptosporidium* em mexilhões *Perna perna* oriundos do Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. 1) Março; 2) Abril; 3) Maio e 4) Junho. A: Laje Preta; B: Praia do Saco. M: marcador de peso molecular. Colunas 1: controles positivos; colunas 2: controles negativos; colunas 3 (amostras 1 sem diluir), 4 (amostras 1 diluições 10^{-1}), 5 (amostras 1 diluições 10^{-2}); 6 (amostras 2 sem diluir), 7 (amostras 2 diluições 10^{-1}), 8 (amostras 2 diluições 10^{-2}), 9 (amostras 3 sem diluir), 10 (amostras 3 diluições 10^{-1}) e 11 (amostras 3 diluições 10^{-2}). 50
- Figura 12:** Amplificação pela Nested-PCR do gene *18SSU rRNA* de *Cryptosporidium* em mexilhões *Perna perna* oriundos do Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. 1) Julho 2) Agosto; 3) Setembro e 4) Outubro. A: Laje Preta; B: Praia do Saco. M: marcador de peso molecular. Colunas 1: controles positivos; colunas 2: controles negativos; colunas 3 (amostras 1 sem diluir), 4 (amostras 1 diluições 10^{-1}), 5 (amostras 1 diluições 10^{-2}); 6 (amostras 2 sem diluir), 7 (amostras 2 diluições 10^{-1}), 8 (amostras 2 diluições 10^{-2}), 9 (amostras 3 sem diluir), 10 (amostras 3 diluições 10^{-1}) e 11 (amostras 3 diluições 10^{-2}). 51

Figura 13: Amplificação pela Nested-PCR do gene *18SSU rRNA* de *Cryptosporidium* em mexilhões *Perna perna* oriundos do Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. 1) Novembro; 2) Dezembro; 3) Janeiro/2010 e 4) Fevereiro/2010. A: Lage Preta; B: Praia do Saco. M: marcador de peso molecular. Colunas 1: controles positivos; colunas 2: controles negativos; colunas 3 (amostras 1 sem diluir), 4 (amostras 1 diluições 10^{-1}), 5 (amostras 1 diluições 10^{-2}); 6 (amostras 2 sem diluir), 7 (amostras 2 diluições 10^{-1}), 8 (amostras 2 diluições 10^{-2}), 9 (amostras 3 sem diluir), 10 (amostras 3 diluições 10^{-1}) e 11 (amostras 3 diluições 10^{-2}).52

Figura 14: Foto do gel de eletroforese da reação Nested-PCR do gene *18SSU rRNA* de *Cryptosporidium* em mexilhões *Perna perna* dos dois locais de estudo A e B. Pente 1- M: Marcador (1 Kb Plus DNA Ladder); coluna 1: controle positivo; coluna 2: controle negativo; coluna 3: amostra A 1.3; 4: B 1.1; 5: B 1.2; 6: B 2.3 (10^{-1}); 7: A 3.1; 8: B 3.1(10^{-1}) 9: B 4.2 (10^{-1}); 10: A 5.1 (10^{-1}); 11: A 5.2 (10^{-1}); 12: A 5.3 (10^{-2}); 13: A 6.2; 14: B 7.3; 17: controle negativo e 18: controle positivo. Pente 2- M: Marcador (1 Kb Plus DNA Ladder); coluna 1: controle positivo; coluna 2: controle negativo; coluna 3: amostra A 8.2 (10^{-2}); 5: B 8.3 (10^{-2}); 6: A 9.1 (10^{-1}); 7: A 9.2 (10^{-1}); 8: A 9.3; 13: A 11.3 (10^{-1}); 14: B 12.2 e 15: B12.3..... 54

Figura 15: Árvore filogenética contruída a partir do seqüenciamento do gene *18S SSUrRNA* de espécimes de *Cryptosporidium* diagnosticadas em amostras de mexilhões *Perna perna* do Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. A análise utilizada na construção da árvore foi a *Neighbor-Joining* e os valores de *bootstrap* encontram-se acima de 97%.56

Figura 16: Foto do gel de eletroforese da reação Nested-PCR do gene *GP60* de *Cryptosporidium parvum* em mexilhões *Perna perna* dos dois locais de estudo A e B. M: Marcador (1 Kb Plus DNA Ladder); coluna 1: controle positivo; coluna 2: controle negativo; coluna 3: amostra B 1.1; 4: B 1.2; 5: B 4.2; 6: A 9.1; 7: A 9.2 (10^{-1}); 8: B 12.2; 9: B12.3 e 10: A 9.3.59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Espécies de *Cryptosporidium* consideradas válidas e as características morfológicas de seus oocistos. 13
- Tabela 2** - Marcadores genéticos comumente usados para a classificação específica, genotípica ou subgenotípica de espécies de *Cryptosporidium* para aplicações tanto em diagnóstico, epidemiologia e genética de populações. 32
- Tabela 3** - Iniciadores usados nas técnicas da PCR e Nested-PCR para identificação da presença do gene *18SSU rRNA* de espécies de *Cryptosporidium* nas amostras de mexilhões *Perna perna*. 45
- Tabela 4** - Componentes com as respectivas concentrações utilizados na técnica PCR para a amplificação do gene *18SSU rRNA* de espécies de *Cryptosporidium* nas amostras de mexilhões *Perna perna*. 45
- Tabela 5** - Condições da amplificação dos iniciadores utilizados na técnica PCR para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em mexilhões *Perna perna*. 46
- Tabela 6** – Teste Z para proporções comparando o número de amostras positivas entre os locais de coleta de mexilhões *Perna perna* A e B. 53
- Tabela 7** – Amostras positivas de mexilhões *Perna perna* para *Cryptosporidium*, dos dois locais de estudo A e B a partir das 12 coletas mensais. Espécies identificadas através do sequenciamento genético (*18SSU rRNA*). Períodos anuais classificados entre seco e chuvoso de acordo com a precipitação pluviométrica. 58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Importância Econômica do Cultivo de Pescados	3
2.2 Mexilhão <i>Perna perna</i> (Linnaeus, 1758)	4
2.2.1 Classificação e Distribuição dos Mexilhões	5
2.2.2 Biologia dos Mexilhões	5
2.2.3 Mtilicultura e Extrativismo.....	7
2.2.4 <i>Perna perna</i> : como alimento, bioindicador e veiculador de patógenos	9
2.3 <i>Cryptosporidium spp.</i>	10
2.3.1 Histórico e Taxonomia	10
2.3.2 Morfologia.....	14
2.3.3 Ciclo biológico	15
2.3.4 Especificidade por hospedeiro.....	16
2.4 Criptosporidiose	17
2.5 Epidemiologia.....	19
2.6 Veiculação de <i>Cryptosporidium spp.</i> por moluscos bivalves.....	23
2.7 Diagnóstico	26
2.7.1 Métodos Microscópicos.....	27
2.7.2 Métodos Imunológicos	27
2.7.3 Métodos Moleculares	29
2.7.3.1 Genes, genótipos e subgenótipos de <i>Cryptosporidium</i>	30
2.7.3.2 Extração de Ácido desoxirribonucléico (ADN ou DNA).....	33
2.7.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR.....	34

2.7.4 Sequenciamento e Filogenia.....	35
2.8 Tratamento e Profilaxia	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Locais de Coleta das Amostras.....	38
3.2 Amostragem	41
3.2.1 Mexilhões <i>Perna perna</i>	41
3.2.2 Dissecção e preparo das Amostras	42
3.3 Locais da Análise Laboratorial.....	44
3.4 Extração de DNA das Amostras.....	44
3.5 Realização da PCR e Nested-PCR.....	45
3.5.1 Controles Positivo e Negativo	46
3.5.2 Eletroforese em gel de agarose.....	46
3.6 Sequenciamento do Gene <i>SSUrRNA</i> e Análise Filogenética	47
3.7 Amostras positivas contendo <i>Cryptosporidium parvum</i>	47
3.7.1 Sequenciamento a partir do Gene <i>GP 60</i>	48
3.8 Análises Estatísticas	48
4. RESULTADOS	49
4.1 Diagnóstico através da Nested-PCR.....	49
4.2 Amostras Sequenciadas	49
4.3. Sequenciamento e Filogenia.....	53
4.4 Amostras positivas para <i>Cryptosporidium parvum</i>	59
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES.....	66
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
8 REFERÊNCIAS.....	68

ANEXOS

ANEXO A - Alinhamento das seqüências das 15 amostras de mexilhões *Perna perna* positivas para *Cryptosporidium*, através da amplificação do gene *18SSUrRNA*, a partir das sequências depositadas no GenBank de *C. meleagridis*, *C. parvum* e *C. andersoni*; respectivamente: AF112574, AF164102 e AY954885. Onde * indicam posições totalmente conservadas; : indica conservação entre os grupos de propriedades de forte semelhança; . indica conservação entre grupos de propriedades de fraca semelhança; — indica polimorfismo entre 2 espécies; ↑ indica polimorfismo entre as 3 espécies; bases em vermelho: mudanças intraespecíficas; Bases em cinza: mudanças interespecíficas.....85

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos o protozoário *Cryptosporidium* tem merecido especial atenção em várias regiões do mundo, por ser infectante para indivíduos que apresentam imunodepressão, como aqueles que sofreram transplantes de órgãos e ingerem drogas imunodepressoras por longos períodos e os portadores da Síndrome da Imunodeficiência adquirida Humana (SIDA).

O gênero *Cryptosporidium* possui espécies capazes de infectar vários hospedeiros animais, tanto domésticos quanto silvestres e também o homem, sendo a única forma de transmissão a ingestão de oocistos infectantes, que pode ocorrer através da água e alimentos contaminados. A importância relativa à estas rotas de transmissão na epidemiologia da criptosporidiose não foi ainda totalmente elucidada, em grande parte devido ao fato de que as tradicionais ferramentas de diagnóstico não permitem a diferenciação entre as fontes de infecção do protozoário, além dos inquéritos epidemiológicos serem raros.

A partir do surgimento e desenvolvimento das técnicas de biologia molecular têm sido possível diagnosticar e diferenciar *Cryptosporidium* em espécies, genótipos e subtipos oriundos de vários tipos de amostras. Essas ferramentas são cada vez mais utilizadas em estudos epidemiológicos da criptosporidiose em áreas endêmicas e epidêmicas, o que melhorou significativamente a compreensão da transmissão do protozoário tanto em humanos como nos animais.

Fontes de contaminação tais como a drenagem hídrica das fezes de animais, o uso de fertilizantes orgânicos e o lançamento de esgotos parcialmente ou não tratados favorecem a contaminação de vários ambientes aquáticos por este protozoário já que os oocistos são eliminados nas fezes dos hospedeiros. Nos mares a presença de *Cryptosporidium* spp. afeta diretamente a qualidade do pescado, como por exemplo mexilhões *Perna perna* presentes na costa brasileira e sendo portanto limitante ao consumo como alimento.

O aumento no consumo do pescado pela população brasileira levou ao conhecimento e aceitação de novos alimentos, por exemplo, os moluscos bivalves como ostras, mexilhões e coquiles, introduzindo-os no cardápio como fonte protéica e substituindo as carnes vermelhas.

Entre os maiores produtores mundiais de moluscos bivalves estão os países asiáticos como China e Japão, e europeus como Espanha e Itália. O Brasil é o segundo maior produtor de moluscos bivalves da América Latina (EPAGRI, 2009). Entretanto, ainda não existe

legislação federal que preconize os parâmetros de segurança alimentar para moluscos bivalves e suas análises obrigatórias. O Estado de Santa Catarina diante da necessidade como o maior produtor nacional de moluscos bivalves, desenvolveu um projeto para o Controle Higiênico e Sanitário de Moluscos Bivalves sendo realizado um monitoramento constante das regiões de cultivo através de análises tanto da água do mar quanto dos moluscos (EPAGRI, 2010).

Em vários países do mundo têm sido realizadas diversas pesquisas no intuito de elucidar o envolvimento de espécies de moluscos bivalves como transmissores de protozoários ao homem através da capacidade concentrar em seus tecidos patógenos presentes na água. Tal capacidade, além de torná-los uma possível fonte de infecção ao homem, também permite a utilização como bioindicadores de contaminação fecal em ambientes aquáticos. Apesar de bioacumularem poluentes e patógenos do meio aquático, ao serem transferidos para áreas limpas, são capazes de depurar as substâncias concentradas em seus tecidos, viabilizando desta forma o cultivo, a comercialização e o consumo seguro de moluscos.

Nos últimos dez anos houve um crescimento tanto no número de moradores do Município de Mangaratiba, do Estado do Rio de Janeiro, quanto de novos pontos de comercialização de pescado nas proximidades da costa marítima, não havendo qualquer meio de tratamento do esgoto doméstico que é despejado no mar, o que indica a possível ocorrência de eutrofização, demonstrando que possivelmente muitos contaminantes estão sendo despejados nas águas das regiões de extração de mexilhões *Perna perna*.

Diante da escassez de dados sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em moluscos bivalves do nosso litoral, inclusive devido à falta de um levantamento epidemiológico; se faz necessária a realização de uma investigação da possível contaminação desses moluscos no Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro, onde a malacocultura é praticada e vem se desenvolvendo.

O trabalho teve como objetivos: diagnosticar e caracterizar geneticamente a(s) espécie(s) e/ou genótipo(s) de *Cryptosporidium* em mexilhões *Perna perna* extraídos de costões rochosos de duas localidades, Lage Preta e Praia do Saco, no Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro; realizar o seqüenciamento e análises filogenéticas, incluindo o depósito das seqüências de *Cryptosporidium* no GenBank; estabelecer possíveis riscos da ingestão dos mexilhões, através da identificação de genótipo(s) e/ou espécie(s) com potencial zoonótico e correlacionar a presença do protozoário com o índice de precipitação pluviométrica da região.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância Econômica do Cultivo de Pescados

A aquicultura tem sido considerada a atividade que mais cresce na indústria de alimentos devido tanto a impulsão governamental quanto tecnológica, no entanto, como na maioria das atividades de produção de alimentos humanos, suscita diversas questões relacionadas ao ambiente e a segurança dos consumidores. Para o seu desenvolvimento é necessário assegurar a sustentabilidade e o equilíbrio entre os riscos para a saúde pública ou ambiental considerando o benefício econômico.

A produção aquícola mundial dos principais grupos de espécies de animais aquáticos; moluscos, crustáceos, peixes marinhos e peixes de água doce, aumentou significativamente entre o período de 1970 a 2008 (Figura 1). Em 2008, a aquicultura gerou 76,4% da produção mundial dos peixes de água doce; 64,1 % dos moluscos e 46,4 % dos crustáceos (FAO, 2010).

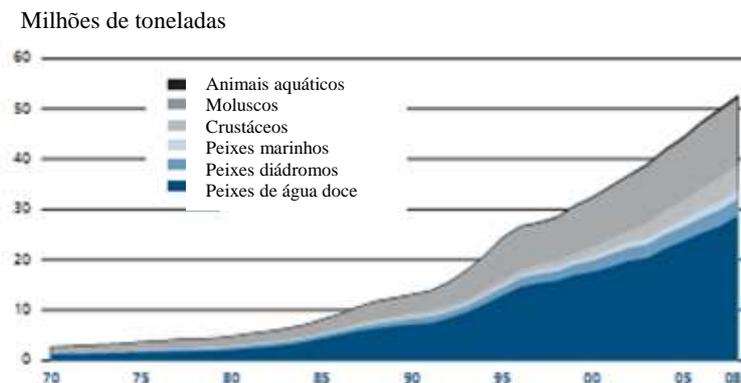


Figura 1: Gráfico de Tendências da produção aquícola mundial - Principais grupos de espécies (1970 – 2008) (Adaptado de EL ESTADO MUNDIAL DE LA PESCA Y LA ACUICULTURA, Departamento de pesca y Acuicultura de La FAO, Roma, 2010).

No Brasil, a produção de pescado aumentou 25% nos últimos anos passando de 990 mil toneladas anuais para 1.240.800 em 2009. A pesca extrativa, tanto marítima quanto continental (rios, lagos, etc) passou no mesmo período de 783.176 toneladas para 825.164 toneladas/ano, um aumento em torno de 5,4% (MPA, 2010).

Entre os maiores produtores mundiais de moluscos bivalves, como ostras, mexilhões e vieiras, estão os países asiáticos como a China e o Japão e europeus como Espanha e Itália. O Brasil é o segundo maior produtor de moluscos bivalves da América Latina (EPAGRI, 2009), sendo o estado de Santa de Catarina responsável atualmente por 95% da produção nacional.

No Brasil, segundo as estatísticas pesqueiras da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca do Ministério da República (2005), a produção estimada de moluscos foi de 13.452,5 toneladas/ano.

Durante a década de 90 houve um aumento significativo no cultivo do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), atingindo a produção da ordem de 12.500 toneladas em 2000, o que colocou o país no segundo lugar na América Latina (CARVALHO FILHO, 2001).

Estes números demonstram o potencial mundial inclusive o do Brasil quanto à produção de moluscos bivalves e a necessidade de se intensificar as pesquisas objetivando a qualidade do alimento sem apresentar ameaças à saúde pública através do seu consumo. Entretanto, ainda não existe legislação federal que preconize os parâmetros de segurança alimentar para moluscos bivalves e suas análises obrigatórias. Somente o Estado de Santa Catarina diante da necessidade como o maior produtor nacional de moluscos bivalves, possui legislação que preconiza o Controle Higiênico e Sanitário de Moluscos Bivalves.

O governo federal após o conhecimento da demanda de uma legislação para o controle tanto dos cultivos quanto do processamento do alimento iniciou a criação de um programa nacional que abrangesse requisitos que garantissem a sanidade do alimento. O Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB) surgiu da iniciativa conjunta entre os ministérios da Pesca e Aquicultura (MPA) e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O MPA estabelece critérios para a retirada dos moluscos bivalves do local de cultivo ou extração, baseados na análise de microorganismos contaminantes e biotoxinas marinhas. Enquanto o MAPA estabelece os requisitos de inspeção industrial e sanitária a serem cumpridos pelos estabelecimentos de processamento de moluscos. O MPA disponibilizou os requisitos do PNCMB para consulta pública de Maio a Julho de 2011. Atualmente encontra-se em fase de finalização para futura publicação.

2.2 Mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758)

Na língua portuguesa, mexilhão ou mariscos são termos usados para denominar diversas espécies da família *Mytilidae*. São organismos que suportam grandes variações ambientais (ANDREU, 1976), possuem grande importância ecológica, sendo muito utilizados como indicadores biológicos no controle da qualidade da água (WINDDWS et al, 1995). São facilmente adaptáveis ao cultivo e representam uma importante fonte de alimento em vários países (FERNANDES, 1985). Eles possuem uma alta capacidade de retenção de nitrogênio,

sendo do ponto de vista nutricional, uma fonte protéica de excelente qualidade (ANDREU, 1976), o que demonstra sua grande importância econômica.

No mundo, existem várias espécies de mexilhões de importância econômica, sendo *Mytilus edulis* a espécie mais estudada. Neste trabalho, a espécie escolhida foi *Perna perna*, por ser a mais comum em nosso litoral, tanto em cultivos como extraídos de rochas naturais, e também devido ao aumento da aceitação por parte dos consumidores levando ao crescimento da consumo e comercialização.

2.2.1 Classificação e Distribuição dos Mexilhões

Pertencentes ao Filo Mollusca, os mexilhões apresentam a concha dividida em duas peças chamada valvas (Bivalves), conhecidos também por Lamelibrânquios por apresentarem brânquias em forma de lamelas ou ainda chamados de Pelecípodes por terem geralmente pés em forma de machado. Ostras e coquiles também fazem parte desta classificação.

Sistematicamente, o mexilhão é classificado como: Domínio: Eucária; Filo: Mollusca; Classe: Bivalvia Linnè, 1758; Ordem: Mytiloidea Férusac, 1822; Família: Mytilidae Rafinesque, 1815; Gênero: *Perna* Retzius, 1788; Espécie: *Perna perna* Linnè, 1758.

Os mexilhões são organismos cosmopolitas, dominantes em muitos ecossistemas costeiros (FERNANDES, 1985). A espécie geograficamente é encontrada nas regiões tropicais e subtropicais dos Oceanos Atlântico e Índico, como também em alguns pontos do mar mediterrâneo. Na América Central, estão presentes no Caribe. Na América do Sul são encontrados na Venezuela, Brasil e Uruguai (AVELAR, 1998).

O *Perna perna* é uma espécie nativa do continente africano, sendo introduzida na América do Sul há mais de 200 anos. Acredita-se que a espécie veio do continente africano fixada em casco de navios negreiros durante o período da colonização do Brasil. Atualmente, os bancos naturais da espécie no Brasil ocorrem principalmente entre Espírito Santo e Rio Grande de Sul (RESGALLA Jr. et al., 2008).

2.2.2 Biologia dos Mexilhões

A espécie *Perna perna*, como todos os mitilídeos, apresenta o corpo com profundas modificações de simetria, sendo a parte posterior desproporcionalmente maior que a anterior (SALAYA et al., 1973).

Seu corpo mole se comprime lateralmente em uma concha rígida, de duas partes (valvas), que se mantêm unidas por um ligamento situado na região dorsal da concha e pelos músculos adutores (anterior e posterior). O ligamento permite a abertura das valvas e os músculos são responsáveis por seu fechamento. Nestes organismos a cabeça e os órgãos dos sentidos associados a ela, não estão presentes, com exceção da boca e dos palpos labiais. O pé, em forma de machado, é frequentemente usado para cavar. Nesta espécie, uma parte do pé, secreta filamentos (bisso) que o prende ao substrato (BARNES, 1990).

Os mexilhões se movimentam através dos seus pés podendo até se desprenderem completamente do substrato, como uma estratégia de sobrevivência, devido a força da tração do pé que leva ao rompimento do bisso (SANTOS, 1982).

As trocas gasosas dos bivalves acontecem através das brânquias, que possuem numerosos e finíssimos vasos sanguíneos. A água traz o oxigênio dissolvido, banha as brânquias e o oxigênio passa por difusão para o interior dos vasos sanguíneos (BERTULLO, 1975).

Apresenta um regime alimentar exclusivamente filtrador, com uma capacidade de bombeamento que pode variar de 0,5 a 5 litros/hora, dependendo das condições ambientais e do tamanho do indivíduo. Além da função respiratória, suas brânquias retêm os alimentos, constituídos basicamente de fitoplâncton, bactérias e detritos orgânicos (AVELAR, 1998). Os mexilhões não possuem capacidade seletiva na filtração dos alimentos, sendo a ingestão de partículas limitada pelo tamanho, variando de 1 μm até larvas de poliquetas de 4,2 mm de comprimento (FERNANDES, et al., 1978).

As partículas de alimentos são envolvidas por um muco, produzido nas brânquias, e são transportadas até os palpos labiais, que selecionam e regulam a quantidade de alimento que passa para a boca. Nos mexilhões as bordas do manto se fundem, formando um sifão inalante (por onde entra uma corrente de água com alimento e oxigênio) e um sifão exalante (por onde sai a água com gás carbônico e excretas) (RUPPERT e BARNES, 1996).

O *Perna perna* normalmente tem um crescimento mais rápido do que espécies originárias de clima temperado. Além disso, o crescimento destes mexilhões em bancos naturais varia de acordo com o tempo de imersão dos animais na lâmina d'água. Animais expostos periodicamente ao ar (região entremarés) crescem mais lentamente; tanto pelo estresse fisiológico como pela privação de alimento (RESGALLA Jr. et al., 2008).

Estes moluscos são dotados de um estômago, uma glândula digestiva (hepatopâncreas) e o intestino, que se abre pelo ânus (Figura 2). A maior parte da digestão é intracelular e ocorre dentro da glândula digestiva. Outra parte, extracelular, acontece dentro do estômago. A principal função do intestino é a eliminação das fezes (STORER e USINGER, 1976).

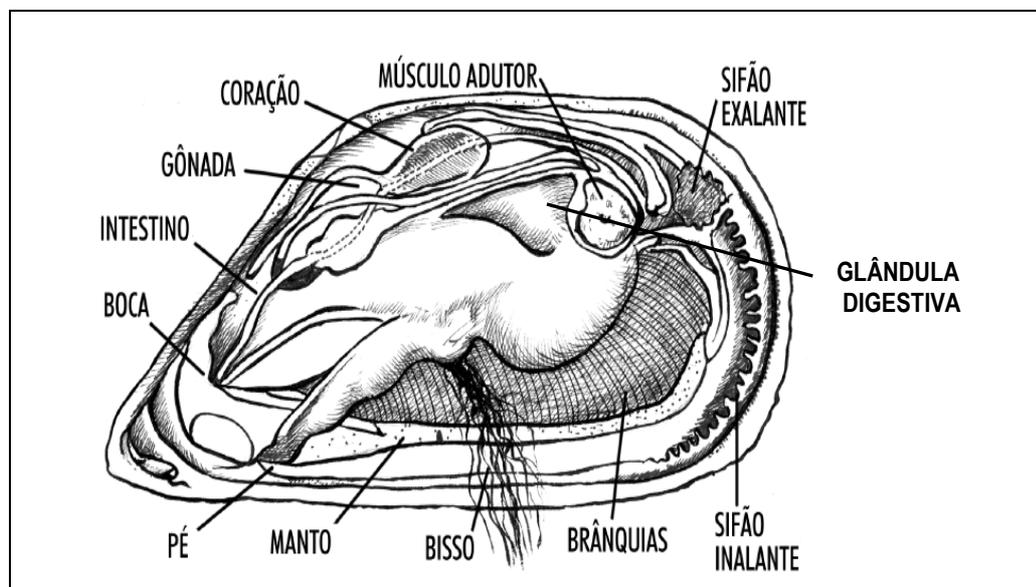


Figura 2: Aspecto geral da anatomia e organização interna do mexilhão (Adaptado: Série Manuais BMLP de maricultura, Cultivo de Mexilhões; Brazilian Mariculture Linkage Program – Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura, p. 6, 2003)

2.2.3 Mitilicultura e Extrativismo

No Brasil, as pesquisas em torno da mitilicultura ou cultivo de mexilhões iniciaram-se na década de sessenta, pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Em 1972, no antigo Instituto de Pesquisa em Arraial do Cabo – RJ foram realizadas pesquisas, buscando uma tecnologia básica para a atividade (GOMES, 1996).

A mitilicultura desenvolveu-se muito no Brasil durante os últimos anos, principalmente no Estado de Santa Catarina, onde a produção anual da espécie *Perna perna* obteve um significativo aumento, de 190 toneladas em 1990 para 9.460 toneladas em 1999 (ROCZANSKI et al., 2000). A expansão dessa atividade motivou a entrada de inúmeras famílias de comunidades pesqueiras no processo produtivo, com reflexos positivos na economia regional e em toda a cadeia de produção.

O sistema de cultivo mais utilizado no Brasil é do tipo suspenso flutuante (“long-line”), em que as cordas contendo os animais são presas a outra corda mestre que flutua na superfície com o auxílio de bóias (SANTOS, 2009).

Segundo Marenzi (2005), a densidade ideal para o cultivo constituiu-se por poucas redes e fixadas dentro do primeiro metro da coluna d’água, onde o desenvolvimento foi maior. Para Armação do Itapocoroy em Santa Catarina, foi recomendado um período de 8 meses de cultivo, onde o tamanho médio obtido foi 7 cm, sendo colhidos no final da primavera com o melhor rendimento.

Atualmente, o cultivo de mexilhões é praticado no litoral brasileiro nos estados de Santa Catarina, do Espírito Santo, do Rio de Janeiro, de São Paulo e do Paraná, apresentando a taxa de crescimento de 22% ao ano (RESGALLA Jr. et al., 2008). Devido ao alto valor do produto e ao baixo custo de produção, a mitilicultura está entre diversos programas governamentais de desenvolvimento econômico e social (SANTOS, 2009).

A grande maioria dos bivalves comercializados no Brasil é proveniente do ambiente natural, o que torna essa atividade economicamente importante, não somente pela força de trabalho, mas também na formação de renda do setor primário da economia (HENRIQUES et al., 2000). Os bancos naturais do mexilhão *P. perna* são explorados desordenadamente pelos extratores "marisqueiros" levando a sua depredação (HENRIQUES, 2004), causando impactos negativos na natureza, impedindo a sua fixação e desenvolvimento.

A principal maneira de obtenção de moluscos da espécie *Perna perna* no Estado do Rio de Janeiro é através do extrativismo. A Associação Livre de Maricultores do Estado do Rio de Janeiro - ALMARJ, localizada em Jurujuba, é a principal responsável pelo beneficiamento do animal em alimento, comercializado pré-cozido e desconchado, embalado em polietileno (LAGE, 2006).

O IBAMA levando em consideração principalmente a importância sócio-econômica que a mitilicultura exerce como mantenedora de inúmeras famílias, determinou a proibição anual da extração de mexilhão *Perna perna* nos costões naturais, no litoral dos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, no período de 01 de setembro a 30 de novembro e de 01 de janeiro a 28 de fevereiro de cada ano (BRASIL, 2003).

2.2.4 *Perna perna*: como alimento, bioindicador e veiculador de patógenos

Os mexilhões também são fonte de alimento alternativo, quando a pesca artesanal não é bem sucedida. Por possuírem ampla distribuição geográfica, serem organismos dominantes e de bom crescimento representam uma importante fonte de alimento em muitas partes do mundo (RESGALLA Jr. et al., 2008).

O *Perna perna* é chamado vulgarmente de “ostra de pobre”, sendo consumido cru ou cozido (SANTOS, 1982). Porém, também tem espaço na culinária sofisticada dos restaurantes a beira-mar constituindo pratos de alto valor do cardápio.

No Brasil, a comercialização dos mexilhões se dava basicamente de duas maneiras: na concha ou desconchado, em embalagens plásticas de 500 gramas ou um quilograma. Atualmente com o aumento da competitividade entre os produtores ocorreu uma diversificação nas formas de apresentação do mexilhão para comercialização, através do processamento do produto e conseqüentemente agregando valor ao mesmo (SANTOS, 2009).

Além da sua importância como alimento, mexilhões *Perna perna* são de grande relevância ecológica já que são organismos que suportam grandes variações ambientais (ANDREU, 1976), sendo utilizados como indicadores biológicos no controle da qualidade da água (WINDDWS et al, 1995).

Moluscos vêm sendo utilizados há décadas como bioindicadores de contaminação aquática por metais pesados e pesticidas (O'CONNOR, 2002). Atualmente, também são reconhecidos mundialmente como bioindicadores de contaminação aquática por bactérias de origem fecal, assim como vírus e protozoários (POMMEPUY et al., 2004). Portanto, a qualidade do alimento está diretamente vinculada à qualidade sanitária do ambiente aquático onde estão presentes, sendo cultivados ou fixados naturalmente nas rochas. O consumo de bivalves crus ou mal cozidos oriundos de regiões poluídas pode apresentar risco a saúde pública.

O lançamento dos esgotos nas águas de reservatórios, lagos, rios e mar é a causa poluidora mais comum registrada no mundo inteiro (ORDÓÑEZ et al., 2005; REICHENHENBACH-KLINKE et al., 1982).

A contaminação do ambiente marinho quer seja química ou microbiológica, principalmente em regiões de alta densidade demográfica; além de colocar em risco a saúde humana, pode causar danos às espécies presentes no habitat, como bivalves por exemplo.

Existem poucos estudos no Brasil sobre a qualidade microbiológica dos bancos naturais de moluscos e a influência da alteração de vários fatores bióticos e abióticos sobre os animais que vivem nesse ambiente (HENRIQUES, 2004).

O hábito de consumo “*in natura*” de mexilhões, algumas vezes apenas levemente aquecidos para a abertura das valvas e a retirada do molusco, apresenta um risco à saúde. O cozimento é altamente recomendado para reduzir o número de microrganismos patogênicos quando presentes neste tipo de alimento (PEREIRA et al., 2004).

Um dos mais importantes aspectos de um programa efetivo de monitoramento de riscos ao consumo de moluscos é a classificação de regiões de cultivo e de extração e a identificação da origem de fontes de contaminação (NSW Food Authority, 2010).

Leal et al. (2011) através de diversos tipos de análises tanto de moluscos quanto da água demonstraram que a contaminação por *Giardia* parece ser freqüente, reforçando a importância do monitoramento contínuo de patógenos em todas as fases da produção. Além disso, a avaliação de fontes de poluição ou contaminantes fecais usando técnicas moleculares é extremamente necessária para uma melhor compreensão da contaminação ambiental e também como uma forma de prever com mais precisão os riscos reais à saúde pública.

Durante o monitoramento da qualidade sanitária dos moluscos bivalves do litoral de São Paulo, diferentes patógenos foram detectados, tanto na água como nas ostras, na fase final da depuração, o que é um sinal preocupante. Entre todos os agentes patogênicos encontrados em ostras após o tratamento de depuração, *Giardia* foi o mais prevalente, já que 54,5% continham este parasita e cinco amostras foram confirmadas como *Giardia duodenalis* através de técnicas de biologia molecular (LEAL et al. 2011).

2.3 *Cryptosporidium* spp.

2.3.1 Histórico e Taxonomia

Ernest Edward Tyzzer, em 1907, fez a primeira descrição do gênero *Cryptosporidium* spp. O pesquisador encontrou o parasito em células epiteliais de estômago de camundongos e organismos similares em epitélio intestinal de coelhos o que o levou a denominar a espécie *Cryptosporidium muris*. A família Cryptosporidiidae foi estabelecida em 1911 por Leger e em 1912, Tyzzer descreveu outra espécie do mesmo gênero, que parasitava as células intestinais de camundongos, denominando-a *C. parvum*.

A patogenicidade do gênero foi relatada pela primeira vez por Slavin, em 1955, que atribuiu a *C. meleagridis* a mortalidade de perus jovens de uma criação comercial e em 1971 o primeiro caso de infecção de um bezerro foi descrito despertando interesse pelo agente em medicina veterinária.

Após a descoberta do gênero *Cryptosporidium* spp., alguns pesquisadores confundiram seus oocistos com esporocistos de *Sarcocystis* spp. Contudo, estudos ultraestruturais subsequentes reafirmaram que os estágios endógenos de *Cryptosporidium* sp. possuíam única organela de fixação. A partir do reconhecimento das diferenças entre *Cryptosporidium* spp. e *Sarcocystis* spp., o conceito de especificidade de hospedeiro foi aplicado ao gênero *Cryptosporidium* spp. Entretanto, foram nomeadas novas espécies de *Cryptosporidium*, com base unicamente no hospedeiro do qual se obtinha o material infectado e posteriormente, estas espécies foram consideradas inválidas devido à baixa especificidade do parasito ao hospedeiro (XIAO et al., 2004).

Um assunto muito polêmico é a proximidade do gênero *Cryptosporidium* com a subclasse Gregarina (parasitos de invertebrados), baseada em algumas características morfológicas, biológicas e bioquímicas. Foram expostas evidências de que *Cryptosporidium* spp. não são “coccidia” *sensu stricto*. Um trabalho de reação sorológica cruzada de *Cryptosporidium* com *Monocystis* sp (Gregarina) e de métodos moleculares mostra evidências de que eles possuem um ancestral comum (CARRENO et al., 1999; BARTA e THOMPSON, 2006). As similaridades entre *Cryptosporidium* e Gregarina incluem o ciclo de vida monoxênico, oocistos com quatro esporozoítas e parede dupla, gamontes extracelulares e localização no trato gastrointestinal do hospedeiro (HIJAWI et al., 2004).

Nos últimos anos, a caracterização molecular de *Cryptosporidium* ajudou a esclarecer a confusa taxonomia de *Cryptosporidium* que baseava-se nos dados morfológicos (FAYER, 2004; XIAO et al., 2004). Essas ferramentas possuem a vantagem de poderem ser aplicadas diretamente à caracterização de oocistos recuperados a partir de amostras fecais ou ambientais.

Durante o 6º Encontro Internacional sobre Genética Molecular Evolutiva em Epidemiologia e Doenças Infecciosas, realizado no Instituto Pasteur em Paris em julho de 2002, foi sugerido que a designação de espécies dentro do gênero *Cryptosporidium* deve atender aos seguintes requisitos básicos: a) Estudo morfométrico dos oocistos; b) caracterização multigênica com genes de segregação independentes, c) estudos de

especificidade do hospedeiro, naturalmente e experimentalmente, e d) o cumprimento ICZN - Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (XIAO et al, 2004; FAYER, 2010).

Com base nesses critérios, são reconhecidas e consideradas como válidas 22 espécies (FAYER e SANTIN, 2009; FAYER et al, 2010; ROBINSON et al 2010) (Tabela 1). Além disso, vários genótipos encontram-se com as classificações pendentes, o que indica que o gênero está em revisão constante (MARTINEZ et al, 2011).

A análise de mais de 3.000 amostras permitiu identificar que *C. parvum* e *C. hominis* foram as espécies mais frequentemente assinaladas em humanos, e sua prevalência varia em diferentes partes do mundo (MORGAN-RYAN et al., 2002). *Cryptosporidium hominis* é mais comum na América do Norte, América do Sul, Austrália e África, enquanto *C. parvum* seria mais prevalente na Europa (SAVIOLI et al., 2006).

A inabilidade de passagens contínuas de *Cryptosporidium* em culturas de células e a inabilidade de criopreservar os oocistos ou os estágios intracelulares são limitações, por exemplo, para desenvolver técnicas padronizadas de identificação. As proteínas de interesse do parasito só podem ser expressas em hospedeiros substitutos, como *Toxoplasma gondii*, bactérias ou leveduras (TZIPORI e WIDMER, 2008). Recentes desenvolvimentos no cultivo “*in vitro*” têm revelado que *Cryptosporidium* pode completar seu ciclo de vida fora das células do hospedeiro

Nos últimos 20 anos houve um período de rápida produção e acúmulo de dados sobre o gênero *Cryptosporidium*, muito se deve aos estudos moleculares. Genótipos de *Cryptosporidium* foram nomeados com base nas diferenças substanciais encontradas nas sequencias da menor subunidade do RNA ribossomal 18S (*SSU RNAr 18S*) ou em outros genes como a actina e proteína de choque térmico 70 kDa (PLUTZER e KARANIS, 2009). Esta nomeação de genótipos ocorreu após a análise filogenética ter eliminado a possibilidade das diferenças serem devido a heterogeneidade entre as cópias do gene. Cerca de 61 genótipos *Cryptosporidium* com status de espécie incerto foram encontrados com base nas sequências SSU RNAr.

Tabela 1 - Espécies de *Cryptosporidium* consideradas válidas e as características morfométricas de seus oocistos.

Ano	Espécies	Autor	Localização	Tamanho do oocisto(µm)
1910	<i>C. muris</i>	Tyzzar	Estômago Intestino delgado	8,4×6,3
1912	<i>C. parvum</i>	Tyzzar	Intestino delgado	5,0×4,5
1955	<i>C. meleagridis</i>	Slavin	Intestino delgado	5,2×4,6
1971	<i>C. wrairi</i>	Vetterling et al	Intestino delgado	5,2×4,6
1979	<i>C. felis</i>	Iseki	Intestino delgado	4,6×4,0
1980	<i>C. serpentis</i>	Levine	Estômago	6,2×5,3
1986	<i>C. baileyi</i>	Current et al	Bursa de Fabrícus Cloaca	6,2×4,6
1995	<i>C. varanii</i>	Pavlassek et al	Estômago Intestino delgado	4,8×4,7
2000	<i>C. andersoni</i>	Lindsay et al	Abomaso	7,4×5,5
2001	<i>C. canis</i>	Fayer et al	Intestino delgado	4,95×4,71
2002	<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan et al	Intestino delgado	4,9×5,2
2002	<i>C. molnari</i>	Álvarez-Pellitero y Sitja-Bobadilla	Estômago	4,72×4,47
2003	<i>C. galli</i>	Ryan et al	Proventrículo	8,2×6,3
2004	<i>C. suis</i>	Ryan et al	Intestino Grosso Intestino delgado	4,6×4,2
2005	<i>C. bovis</i>	Fayer et al	Intestino delgado	5,0×4,5
2008	<i>C. fayeri</i>	Ryan et al	Intestino delgado	4,9×4,3
2008	<i>C. fragile</i>	Jirku et al	Estômago	6,2×5,5
2008	<i>C. ryanae</i>	Fayer et al	Desconhecido	3,73×3,16
2008	<i>C. macropodium</i>	Power y Ryan	Desconhecido	4,9×5,4
2009	<i>C. xiaoi</i>	Fayer y Santin	Desconhecido	3,9×3,4
2010	<i>C. ubiquitum</i>	Fayer et al	Desconhecido	5,19×4,87
2010	<i>C. cuniculus</i>	Robinson et al	Intestino delgado	5,98×5,38

Fonte: Adaptado de Martinez et al., 2011.

Os genótipos de cervo, macaco, porco, gambá, cavalo, coelho e rato já foram encontrados em humanos (AJJAMPUR et al, 2007;. CAMA et al, 2003;. ROBINSON et al, 2008;. SOBA et al, 2006;. XIAO et al, 2004). Estudos de transmissão cruzada têm demonstrado limitadas diferenças biológicas entre alguns dos genótipos, alguns dos quais têm mostrado oocistos com morfologia diferente de *C. parvum* (XIAO et al., 2004).

A classificação taxonômica do protozoário *Cryptosporidium* sp. segundo Levine et al. (1980) é: Reino Protista; Sub-reino Protozoa; Filo Apicomplexa Levine, 1970; Classe Sporozoa Leuckart, 1879; Subclasse Coccidia Leuckart, 1879; Ordem Eucoccidia Léger e Duboscq, 1910; Sub-ordem Eimeriina Léger, 1911; Família Cryptosporidiidae; Gênero *Cryptosporidium*.

Estudos filogenéticos além da microscopia eletrônica levaram alguns autores a uma nova proposição taxonômica (ADL et al., 2005). É uma proposta que difere da sistemática de Levine (1980), pois os autores adotaram um sistema hierárquico sem a designação formal em

classe, subclasse, super ordem ou ordem; apenas consideraram super grupos e grupos. Desta forma os eucariontes seriam classificados em seis grupos: (1) Opisthokonta, (2) Amoebozoa, (3) Excavata, (4) Rhizaria, (5) Archaeplastida e (6) Chromalveolata. Os autores acreditam que esta classificação seria mais útil e menos problemática que a tradicional. Como vantagens, mencionam o número limitado de nomes classificados e também a maior flexibilidade de modificação. No entanto, a classificação de Levine continua sendo a oficialmente adotada.

A classificação taxonômica do protozoário *Cryptosporidium* sp. segundo Adl et al. (2005) é: Chromalveolata Adl et al., 2005; Alveolata Cavalier-Smith, 1991; Apicomplexa Levine, 1980, emend. Adl et al., 2005; Conoidasida Levine, 1988; Coccidiasina Leuckart, 1879; *Cryptosporidium*.

O gênero *Cryptosporidium* é considerado pertencente ao Filo Apicomplexa, porém, há controvérsias quanto a esta classificação. Apesar de várias características comprovarem tal fato, outras como o desenvolvimento e o ciclo de vida o tem classificado dentro da classe dos coccídios (FAYER e XIAO, 2008).

2.3.2 Morfologia

O gênero *Cryptosporidium* possui morfologia variável de acordo com os estágios evolutivos e entre as diferentes espécies. Em cortes histológicos, os parasitos aparecem como pequenos corpos basofílicos aparentemente aderidos à superfície das células, dando à borda das microvilosidades uma aparência granulada. A microscopia eletrônica tem confirmado que a sua localização é intracelular, porém extracitoplasmática (O'DONOGHUE, 1995).

Existem dois tipos de oocistos: o primeiro tipo, aproximadamente 80% dos oocistos produzidos, possui paredes espessas e resistentes e são eliminados nas fezes, sendo responsáveis pela transmissão entre hospedeiros; já o segundo tipo, em torno de 20%, possui paredes delgadas e liberam os seus esporozoítos no intestino, responsáveis pela auto-infecção (AMARANTE, 1992; LALLO, 1996).

A parede do oocisto possui uma camada interna e outra externa, com a ausência de esporocisto comumente encontrada em outros coccídios. Em uma das extremidades, o oocisto possui uma região de fragilidade que origina uma sutura e é através da abertura desta que os esporozoítas deixam o oocisto durante o desencistamento (REDUKER et al., 1985).

Os esporozoítas e merozoítas de *Cryptosporidium* são similares aos dos outros coccídios, possuindo as organelas características do filo. Desta maneira, estão presentes as

roptrias, micronemas, grânulos densos, núcleo, ribossomos, microtúbulos e o anel apical. Porém, outras organelas estão ausentes, como os anéis polares, mitocôndria, microporos e conóide. Esporozoítas e merozoítas são englobados pelas microvilosidades das células epiteliais, formando um vacúolo parasitóforo. Ocorre a formação da organela de fixação ou alimentação por parte do parasito e da célula parasitada (FAYER et al., 1997).

Microgametócitos imaturos assemelham-se a esquizontes, porém eles contêm núcleos pequenos e compactos. Os microgametas possuem forma alongada (1,4 x 0,5µm em *C. parvum*), com a extremidade anterior achatada, sendo que há ausência de flagelos e mitocôndria. Macrogametócitos de *C. parvum* medem aproximadamente 4- 6 µm e são esféricos a ovóides (FAYER et al., 1997).

2.3.3 Ciclo biológico

Cryptosporidium spp. possui ciclo monoxeno, tendo seis estágios de desenvolvimento no organismo, todos estes se desenvolvem infectando a célula do hospedeiro localizando-se em vacúolo parasitóforo. A localização do protozoário é extracitoplasmática e intracelular e se encontra nas microvilosidades das células epiteliais (SMITH, 1993).

Após o desencistamento os esporozoítos são liberados do oocisto e parasitam as células epiteliais do trato gastrointestinal ou respiratório (Figura 3). Nessas células, os parasitas sofrem multiplicação assexuada (esquizogonia ou merogonia) e depois a multiplicação sexuada (gametogonia), produzindo microgametas e macrogametas. Em seguida da fecundação do macrogametas pelos microgametas, oocistos se desenvolvem e esporulam no próprio local de infecção. Dois tipos diferentes de oocistos são produzidos, depois da esporogonia: um de parede espessa, que é comumente excretado pelo hospedeiro e um de parede fina, que é envolvido na autoinfecção (PUTIGNANI E MENCHELLA, 2010).

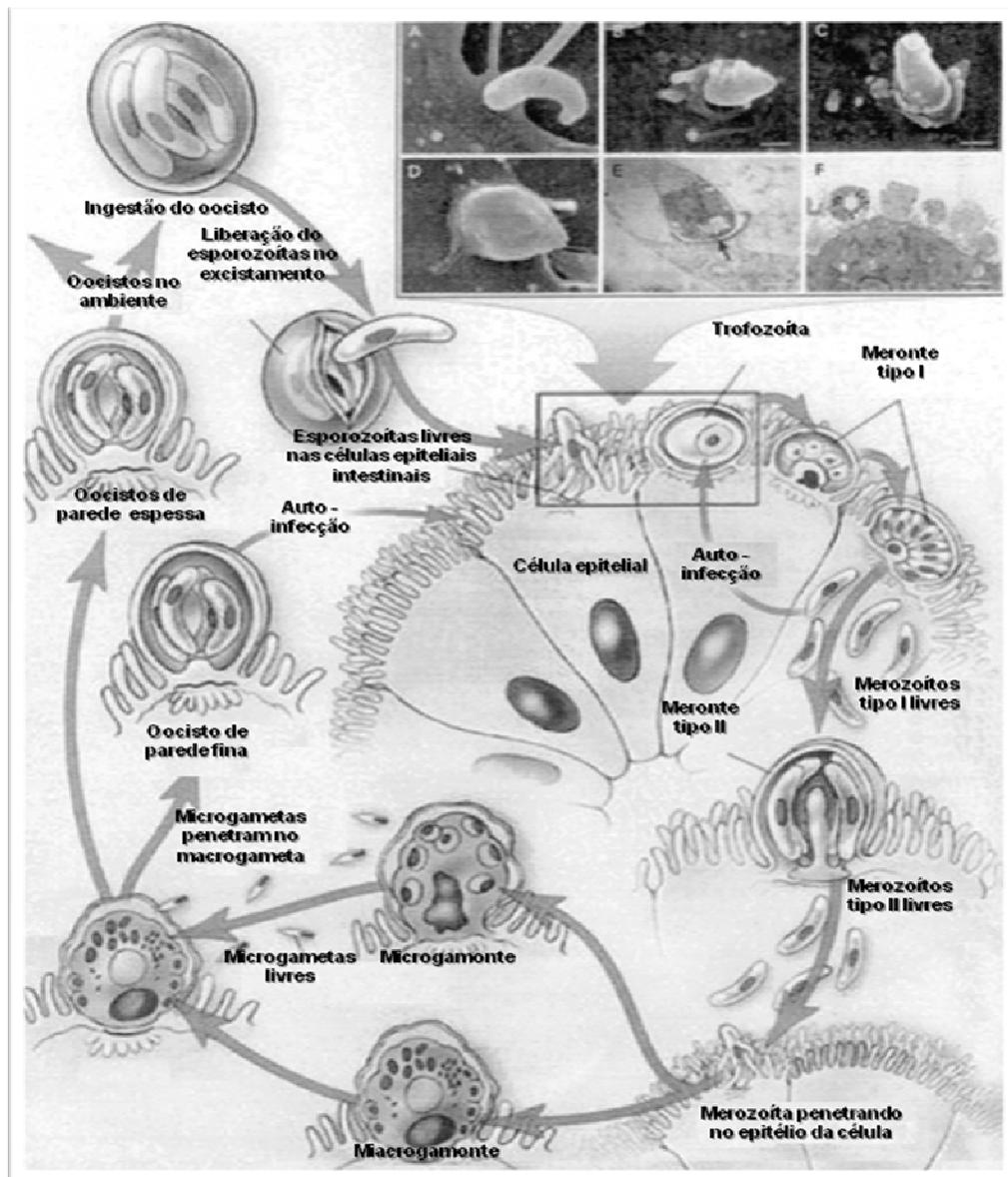


Figura 3: Imagem do ciclo biológico de *Cryptosporidium parvum*, demonstrando todas as fases endógenas no epitélio intestinal (CHEN et al., 2002).

2.3.4 Especificidade por hospedeiro

A existência de espécies ou genótipos adaptados a um hospedeiro específico indica que a transmissão cruzada de *Cryptosporidium* entre os diferentes grupos de animais é geralmente limitada. *Cryptosporidium parvum* tem recebido uma atenção maior por ser transmitido para outros hospedeiros além do hospedeiro original de sua descrição. Primeiro, pensava-se que *C. parvum* pudesse infectar várias espécies de animais, principalmente mamíferos. O uso das ferramentas moleculares provou a sua ineficiência em infectar

mamíferos selvagens. Atualmente, a comunidade científica concorda que esta espécie infecta primariamente ruminantes e humanos (Mendonça et al., 2007).

No hospedeiro bovino foram registradas oito espécies de *Cryptosporidium* e um genótipo adicional infectando este hospedeiro (SANTIN e TROUT, 2008), embora só quatro espécies sejam diagnosticadas rotineiramente, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium andersoni* e *Cryptosporidium ryanae* (anteriormente conhecido como o genótipo cervo-like) (FAYER et al, 2006, 2007, 2008; LANGKJAR et al, 2006; FENG et al, 2007; BROOK et al, 2008; FELTUS et al, 2008; SANTIN et al., 2004, 2008).

A maioria dos métodos da PCR usa *primers* com regiões conservadas para todas as espécies de *Cryptosporidium*, apenas a espécie dominante em um hospedeiro é rotineiramente identificada. Assim, as infecções com várias espécies (infecções comcomitantes) se tornam difíceis de diagnosticar e as espécies com menor frequência não são detectadas (XIAO e RYAN, 2008).

Infecções naturais por *C. parvum* foram encontrados ocasionalmente em outros mamíferos, como exemplos os camundongos e cães, apesar dos animais de companhia serem freqüentemente infectados com espécie específica (XIAO e FAYER, 2008). Desta forma, os cães são quase exclusivamente infectados com *Cryptosporidium canis* e gatos com *C. Felis*. O papel de cães e gatos na transmissão da criptosporidiose humana parece bastante limitado. De fato, infecções por *C. canis* e *C. felis* são raramente relatados em seres humanos, apesar de seu contato próximo ser generalizado.

2.4 Criptosporidiose

A criptosporidiose é conhecida por sua ocorrência tanto no homem como em animais, principalmente em imunocomprometidos (CRAWFORD e VERMUND, 1988). No entanto, a infecção pode ocorrer em indivíduos saudáveis, os quais apresentam um quadro clínico autolimitante. Isto torna preocupante a ocorrência de portadores assintomáticos para a saúde pública.

Em 1976, dois relatos simultâneos de criptosporidiose em pacientes humanos imunocompetentes e com imunodepressão chamaram a atenção na medicina humana, pelo fato de o protozoário ainda não ter sido diagnosticado nesse hospedeiro (MEISEL et al., 1976; NIME et al., 1976).

A doença é caracterizada por diarreia, dores abdominais, febre baixa, fadiga, perda de apetite e de peso, náusea e vômito, além de outras manifestações clínicas que incluem colecistite, hepatite, pancreatite e problemas respiratórios. A susceptibilidade e a severidade da doença variam entre os indivíduos e dependem do seu estado imunológico e nutricional e exposição prévia (CURRENT, 1994). O período entre a ingestão de oocistos e o aparecimento dos sintomas é de 7 a 10 dias, podendo variar de 5 a 28 dias.

Observa-se a forma aguda geralmente em crianças com menos de cinco anos de idade (GRIFFITHS, 1998), nesta faixa etária associada a episódios de diarreia prolongada pós-infecção, acarretando má absorção e atraso do crescimento (AGNEW *et al.*, 1998). Entretanto há trabalhos que demonstram infecções em crianças sem presença de diarreia (CARVALHO-ALMEIDA *et al.*, 2006). A forma crônica geralmente acomete indivíduos mal nutridos ou imunodeprimidos. Em indivíduos imunocompetentes desenvolvem gastroenterite normalmente autolimitada (POZIO *et al.*, 1997).

A doença apresenta-se na forma digestiva (93%) ou pulmonar (33%). A digestiva caracterizada por diarreia líquida, com eliminação de fezes de dez a 20 vezes por dia, ocasionando perda de 10 litros de água diariamente. Quando há infecção maciça, pode haver invasão pulmonar gerando pneumopatias intersticiais (MACKENZIE *et al.*, 1994).

A dose infecciosa de *C. parvum* em pacientes imunocomprometidos ainda não foi estabelecida, no entanto, acredita-se que a doença possa ser causada por um único oocisto. As taxas de mortalidade por infecção por *C. parvum* entre estes indivíduos variam de 52% para 68% (ROSE, 1997).

No Brasil, 2842 casos da doença foram identificados no período de 1980 a 1997 entre os pacientes imunodeprimidos, particularmente nos indivíduos portadores da SIDA, sendo as regiões Nordeste e Sudeste do País as áreas mais afetadas (CRT, 1997). Na cidade de Recife, a frequência de infecção pelo *Cryptosporidium* spp. nestes pacientes chegou a um percentual de 21,8%, sendo superior a frequência de outros patógenos veiculados por água e/ou alimentos (ARCOVERDE, 2001).

Segundo Fayer (2010) as espécies *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. canis*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. parvum* e *C. suis* são reconhecidas como causadoras da criptosporidiose humana. Este foi o primeiro relato da espécie *C. baileyi* em humanos, até o momento não houve outro estudo que comprovasse o seu envolvimento causando a criptosporidiose no homem.

Muitos casos de transmissão de *Cryptosporidium* sp. foram relatados entre membros da mesma residência ou família, parceiros sexuais (heterossexuais e homossexuais), funcionários e pacientes de hospitais e crianças atendidas em creches. Numerosos casos de transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* sp. de animais para o ser humano foram também inferidos em estudos epidemiológicos, a maioria envolvendo pessoas que cuidavam de animais de estimação ou de fazenda, especialmente bovinos. A transmissão zoonótica foi confirmada várias vezes por infecção acidental de atendentes de animais, estudantes ou pesquisadores que manipulavam isolados veterinários (O'DONOGHUE, 1995).

Dentre as diversas formas de transmissão da criptosporidiose, destaca-se a veiculação por água e alimentos (SMITH, 1993), sendo o mecanismo de transmissão influenciado pelo nível de contaminação ambiental, sobrevivência do oocisto às condições do meio (ROBERTSON et al., 1992), e resistência do oocisto aos mais variados métodos usados em tratamentos da água; seja a cloração, a ozonização ou métodos de filtração (KORICH et al., 1990).

A intensidade das manifestações clínicas, da patogenia, o grau de excreção de oocistos e a incidência de diferentes espécies, inclusive o homem interferem na identificação da espécie causadora da doença. Portanto, para determinar o risco à saúde pública da criptosporidiose é importante a correta identificação de espécies e genótipos, tanto em amostras humanas como animais e ambientais, sendo essencial a utilização de técnicas moleculares como a PCR (MARTINEZ et al, 2011).

2.5 Epidemiologia

Vários fatores influenciam a epidemiologia dessa protozoose: desde o tamanho reduzido e variado dos oocistos (em média 4,5 x 5,5 µm), sendo facilmente dispersos ocasionando uma ampla contaminação ambiental, além de passarem facilmente por filtros usualmente empregados nos processos de tratamento de água; até o fato da infecção ocorrer por baixas doses infectantes. Outro fator importante são os hospedeiros que servem de reservatórios do protozoário eliminando oocistos esporulados através das fezes no ambiente possibilitando a permanência de doses infectivas a um hospedeiro susceptível.

Estudos de epidemiologia molecular em países em desenvolvimento revelam que a complexidade na transmissão de *C. hominis* depende do país. Nesses países, geralmente há uma alta endemicidade de *Cryptosporidium* e baixa ocorrência de surtos, sendo as crianças e os indivíduos imunocomprometidos os mais afetados. Os resultados de estudos de subtipagem

de *C. hominis* (alelos Ia, Ib, Id, Ie) revelam a diversidade da transmissão em áreas endêmicas e enfatizam a necessidade de extensivos estudos de epidemiologia da criptosporidiose (CAMA et al., 2007, 2008; CHALMERS et al. 2008).

A transmissão direta (contato com pessoas ou animais infectados havendo a ingestão dos oocistos) ou indireta (ingestão de água contaminada e de alimentos contaminados, inalação dos oocistos) é favorecida pela alta densidade populacional (CACCIÒ et al., 2005). Águas utilizadas em recreação também representam grande problema de saúde pública, em virtude do grande número de banhistas e da resistência de *Cryptosporidium parvum* aos desinfetantes utilizados, especialmente o cloro (CARPENTER et al., 1999).

O emprego de fezes de animais como adubo orgânico em culturas vegetais pode causar infecção direta pela formação de aerossóis ou contaminar águas superficiais e subterrâneas. A ingestão de água contaminada mostra-se a principal via de infecção humana (FAYER et al., 2000). Pelo menos 165 surtos epidêmicos foram registrados nos últimos anos por consumo de água contaminada com *C. parvum* (KARANIS et al., 2007).

Outros fatores relevantes a serem considerados em estudos epidemiológicos é a possibilidade da veiculação hídrica e que a forma infectante, o oocisto, apresenta alta resistência às adversidades ambientais. Estes podem se manter viáveis na água do mar por 35 dias e em fezes cerca de 130 dias. Com congelamento a -22° C uma pequena proporção de oocistos ainda permanecem viáveis e capazes de resistir por 775 horas. A dessecação é o único fator que realmente afeta a manutenção da infectividade. Com 4 horas de dessecação 100% dos oocistos morrem (ROBERTSON et al., 1992; TAMBURRINI et al., 1999);). A irradiação solar também representa um importante fator na inativação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (KING et al., 2008).

O protozoário possui distribuição mundial, encontrado tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Relatos evidenciam que o parasito está presente em 80 a 97% das águas superficiais e em 26 a 54% das águas tratadas (SMITH e ROSE, 1998; LUNA et al., 2002).

Nos EUA, entre 1990 e 2000 pelo menos dez surtos de criptosporidiose foram associados com água potável, tendo um aumento nos meses mais quentes do ano (AMIN, 2002). Em 2003 confirmaram-se 25 casos humanos de criptosporidiose em Surrey, no Canadá. Destes, 15 pessoas tinham nadado em piscina recreativa, em cuja água foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp.; nove casos foram diagnosticados como *C. parvum* (LOUIE et al., 2004).

Nas últimas décadas vários países da Europa tiveram problemas com surtos epidêmicos de criptosporidiose. Na Finlândia, ocorreu em 2002 o primeiro registro de *Cryptosporidium* em águas superficiais e estimam-se, anualmente, 15 episódios de criptosporidiose em humanos (RIMHANEN-FINNE et al., 2002). Na Noruega entre 1992 e 2003, o número de ocorrência de criptosporidiose foi considerado baixo; houve 67 casos suspeitos da infecção, e apenas dois foram comprovados como positivos ambos em 2000 (ROBERTSON et al., 2006). Em 2005, 62 casos de infecção por *C. parvum* foram confirmados em Perthshire (Escócia), relacionados à visita a um centro de animais selvagens (MCGUIGAN, 2005).

Na Austrália, O'Brien et al. (2008) realizaram um estudo com crianças imunocompetentes com sintomas gastrointestinais. Os autores demonstraram que, das crianças isoladas positivas para *Cryptosporidium*, 82% estavam infectadas com *C. hominis* e 18% com *C. parvum*.

Em um estudo realizado na Holanda, no qual foram empregados os *loci* dos genes *18S rDNA*, *COWP*, *HSP70*, microssatélite *ML1* e *GP60*, foram encontrados 70% de *C. hominis*, 19% de *C. parvum*, 10% de infecção mista (*C. hominis* + *C. parvum*) e 1% de *C. felis*. Nas infecções mistas, as crianças apresentaram principalmente *C. hominis*; nos adultos, a predominância foi de *C. parvum*. Nas fezes de bovinos, foi encontrado apenas *C. parvum*. A subtipagem revelou dois ciclos de transmissão: transmissão homem–homem e transmissão zoonótica (WIELINGA et al., 2008).

No continente asiático a frequência de criptosporidiose mostra-se relativamente pequena. Segundo Wang et al. (2002), a taxa de infecção por *C. parvum* na província Anhui (China) chega a 1,33%. A taxa detectada em várias províncias ficou entre 1,36 e 13,3%. Um estudo em Jeollanam-do (Coreia) demonstrou que apenas 1% dos pacientes imunocompetentes com diarreia foi positivo para *C. parvum* (LEE et al., 2005). Em pacientes HIV-soropositivos, no norte da Índia, 10,8% foram confirmados positivos para *C. parvum* (MOHANDAS et al., 2002). No Irã, pesquisa com indivíduos HIV positivos apresentou prevalência de 1,5% para *C. parvum* (ZALI et al., 2004).

Estudo com crianças africanas da Uganda que tinham diarreia persistente detectou prevalência de *Cryptosporidium* spp. de 31,3%. Entre as crianças com HIV, a taxa ficou em 73,6% (TUMWINE et al., 2005). Em Gana, uma investigação expôs incidência de *Cryptosporidium* spp. de 27,8 e 15,6% em crianças com e sem diarreia, respectivamente (ADJEI et al., 2004).

No Peru, Xiao et al. (2001) comprovaram prevalência de *Cryptosporidium* spp. em 21% das crianças de uma comunidade urbana de baixa renda. No México, um trabalho feito em três comunidades de Chihuahua encontrou taxa de 70,4% de *Cryptosporidium* spp. (REDLINGER et al., 2002). Nessas localidades não havia serviço municipal de saneamento, e a maioria da população não tinha água encanada em suas casas. Na Guatemala, pesquisa feita com crianças de duas comunidades, obteve uma prevalência de 32% de *Cryptosporidium* spp. (LAUBACH et al., 2004). Em trabalho desenvolvido na ilha de San Carlos (Venezuela), Chacín-Bonilla et al. (2008) detectaram 13% de indivíduos infectados por *Cryptosporidium*, dos quais 50,7% residiam nas áreas mais pobres da região.

Há também alguns relatos de surtos de criptosporidiose em viajantes após visita ao México, Reino Unido e Austrália, que consumiram alimentos suspeitos de estarem contaminados com *Cryptosporidium* sp. como saladas, leite cru, salsichas e linguiças (SLIFKO et al., 2000).

No Brasil, durante muito tempo os estudos sobre *Cryptosporidium* spp. e criptosporidiose relacionavam-se a levantamentos epidemiológicos em algumas regiões do país. Atualmente já existem investigações realizadas em praticamente todas as regiões, e muitas delas incluem caracterização genotípica e sequenciamento.

Oshiro et al. (2000), na zona urbana de Campo Grande (Mato Grosso do Sul) encontraram a prevalência de *C. parvum* em menores de cinco anos de 1,1%. Em Goiânia (Goiás), Pereira et al. (2002) detectaram *C. parvum* em 18,7% das crianças com menos de 10 anos hospitalizadas por diarreia. Mascarini e Donalísio (2006) encontraram uma prevalência de 15,5% (2002) e 3,7% (2003) de *Cryptosporidium* sp. em crianças de creches municipais de Botucatu (São Paulo). Oliveira-Silva et al. (2007) encontraram *Cryptosporidium* sp. em 8,6% dos pacientes com HIV/Aids na região do Triângulo Mineiro, no período de julho de 1993 a junho de 2003.

No Estado de São Paulo, foi diagnosticado um surto diarreico ocorrido em 2001 numa creche onde 12,9% das crianças foram infectadas com *Cryptosporidium* spp. e após a genotipagem foi identificado *C. hominis* (GONÇALVES et al., 2006).

Araújo et al. (2008) realizaram genotipagem de *Cryptosporidium* isolado de cinco pacientes portadores da SIDA e de nove crianças imunocompetentes do Estado de São Paulo. Entre as crianças os padrões genotípicos do parasito encontrado foram compatíveis com os de *C. hominis* e *C. parvum*; já quanto aos pacientes os padrões corresponderam a *C. hominis*, *C. parvum* e *C. meleagridis*.

Com relação à presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ambiente, Gamba *et al.* (2000) apontaram a contaminação de águas superficiais em oito de dez pontos examinados no município de Itaquaquecetuba, Estado de São Paulo.

Franco *et al.* (2001), diagnosticou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais do rio Atibaia, no Estado de São Paulo. No município de Campinas, o protozoário foi observado em água mineral de marcas conhecidas no mercado (0,2 oocistos/L a 0,5 oocistos/L) (FRANCO e CANTUSIO NETO, 2002).

No Município do Rio de Janeiro, por meio de análise morfométrica e molecular de *Cryptosporidium* em 26 amostras fecais de crianças e adultos HIV-positivos, Silva (2004) observou que 22 amostras tinham perfil próximo a *C. hominis*, dois com perfis compatíveis com genótipo zoonótico de *C. parvum* e dois com padrão misto.

Iacovski *et al.* (2004) averiguaram amostras de lodo de esgoto da Estação de Tratamento de Esgoto de Florianópolis (Santa Catarina), mediante técnicas de separação imunomagnética e imunofluorescência (IMS-IF): das 27 amostras coletadas, 74,07% possuíam oocistos de *Cryptosporidium* sp.

2.6 Veiculação de *Cryptosporidium* spp. por moluscos bivalves

A questão preocupante em torno dos moluscos marinhos como alimento é que, como são organismos filtradores, a qualidade do produto está diretamente relacionada ao meio onde estão inseridos. A qualidade da água do mar que banha os costões rochosos ou regiões de cultivos é de fundamental importância já que esta garantirá a sanidade do alimento caso esteja livre de todo tipo de contaminação, ou inviabilizará a atividade econômica colocando em risco a produção caso seja confirmada a contaminação.

Pesquisas demonstraram que protozoários como *Cryptosporidium* spp. podem ser transmitidos ao homem por bivalves marinhos naturalmente contaminados e têm sido detectados com relativa frequência em várias espécies, a maioria coletada de águas costeiras em toda a Europa (França, Irlanda, Itália, Países Baixos, Espanha, Reino Unido) e Estados Unidos, podendo levar a infecção humana após a sua ingestão (ROBERTSON, 2007; FAYER *et al.*, 1998; GÓMEZ-BAUTISTA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2006;).

Gómez-Bautista *et al.* (2000) encontraram oocistos e cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp, respectivamente, em coquiles e mexilhões do mar da Galícia, na Espanha; confirmando sua capacidade de concentrar esses protozoários em seus tecidos. Tal

capacidade, além de torná-los uma possível fonte de infecção ao homem, são também considerados bioindicadores de contaminação fecal. Gomez-Couso et al. (2003) demonstraram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. viáveis em ostras comercializadas ao longo da costa Atlântica espanhola (Galícia).

Gómez-Couso et al. (2005) infectaram experimentalmente amêijoas com *C. parvum* e investigaram a presença de oocistos em diferentes órgãos. Estavam presentes nas brânquias, no estômago, na glândula digestiva e no intestino. A presença dos oocistos no conteúdo intestinal demonstrou a possibilidade de disseminação deste protozoário para o meio ambiente. Também foram encontrados oocistos no muco branquial sugerindo a ocorrência de repetidas filtrações e a permanência de sua capacidade infectiva.

Schets et al. (2007) encontraram oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* spp em ostras comerciais e não comerciais de regiões do mar de Oosterchelde, na Holanda, que recebiam efluentes de esgotos domésticos sem tratamento.

A presença de indicadores fecais e patógenos entéricos em mexilhões da espécie *Mytilus edulis* de comunidades em Nunavik, Quebec provou o risco do consumo do molusco cru. Segundo Lévesque et al., 2010 a presença de diversos microrganismos indicadores de contaminação fecal como *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, além dos protozoários potencialmente zoonóticos *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp., reafirmam a necessidade da recomendação do consumo de moluscos bem cozidos.

Ao comparar o número de microrganismos indicadores de contaminação ambiental por esgoto encontrados em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* (da Costa de Ismir na Turquia) como Coliformes fecais, entre as quatro estações do ano, Kacar (2011) afirmou que os resultados foram maiores na Primavera e no Outono. Segundo o autor, a contaminação bacteriana nestas estações pode estar relacionada a algumas condições ambientais, tais como períodos de chuvas, o que provavelmente afetou a qualidade dos mexilhões coletados naqueles meses.

Levantamentos da qualidade da água do rio Motueka foram realizados para avaliar a origem e o destino dos contaminantes fecais (*Escherichia coli* e enterococos) transportados para a Baía de Tasma na Nova Zelândia. Mexilhões coletados nesta região costeira apresentaram concentrações elevadas tanto de *E. coli* quanto enterococos em seus tecidos. A aplicação de marcadores de origem microbiana usando ensaios da PCR identificaram a presença de contaminação fecal de animais ruminantes, como bovinos e ovinos, em amostras

de água e de mexilhão. A detecção de contaminação fecal de ruminantes nos mariscos localizados a seis km do mar destaca a estreita ligação entre o uso da terra e a qualidade dos recursos costeiros altamente valorizados da Nova Zelândia (CORNELISEN et al, 2011).

Mexilhões foram utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental de rios da Irlanda. Utilizando técnicas biomoleculares e Imunofluorescência Direta (IFA) combinada com a técnica Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) foram utilizadas para avaliar a presença e a concentração de enteropatógenos humanos como *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, entre outros. *Cryptosporidium*, envolvido em epidemias gastrointestinais na Irlanda, foi encontrado em locais que recebiam escoamento agrícola e lançamento de efluentes contendo resíduo fecal humano e animal. A contaminação de águas irlandesas por enteropatógenos humanos demonstraram risco para saúde pública, tanto ao consumo de água potável como para recreação e actividades aquáticas (LUCY et al, 2008).

No Brasil, oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram diagnosticados em ostras e em “mariscos de areia” do Litoral Norte do Estado de São Paulo. A concentração estimada de oocistos por animal foi de 12 oocistos por ostra e de 60 oocistos por marisco, quantidade suficiente para causar infecção no homem, após a ingestão de mariscos crus ou mal cozidos (LEAL et al., 2008).

Apesar da capacidade dos moluscos bivalves de bioacumularem poluentes e patógenos do meio aquático, ao serem transferidos para áreas limpas, são capazes de depurar as substâncias concentradas em seus tecidos. Nappier *et al.* (2010) analisaram duas espécies de ostras de Baltimore – USA quanto a capacidade de bioacumulação, retenção e depuração de enteropatógenos humanos, dentre eles, *Cryptosporidium parvum*. A ostra *Crassostrea ariakensis* quando comparada com a ostra *C. Virgini* demonstrou ter maior capacidade bioacumuladora de enteropatógenos e menor capacidade de depuração. Os autores destacaram o papel das espécies na transmissão de várias doenças e a ameaça à saúde pública para as pessoas que consomem as ostras cruas de locais contaminados. Entretanto, o processo de depuração aplicado aos moluscos pode ser ineficaz em relação ao *Cryptosporidium* sp. Oocistos foram detectados em amostras com tempos de depuração superior a 72 horas (FREIRE-SANTOS et al, 2000)

A inativação de *Cryptosporidium parvum* e outros patógenos em moluscos crus proporcionaria maior segurança alimentar diminuindo o risco aos consumidores. Uma das formas de tratamento alternativo de alimentos é o Processamento de Alta Pressão Hidrostática do inglês High hydrostatic Pressure Processing (HPP). Collins e colaboradores (2005)

avaliaram a viabilidade de oocistos de *C. parvum* em ostras *Crassostrea virginica*. As ostras foram artificialmente expostas aos oocistos de *C. parvum* e submetidas ao tratamento HPP. Este método foi significativamente eficaz na redução do número de filhotes de rato positivos alimentados com tecidos de ostra expostos a oocistos de *C. parvum*. Este tipo de processamento de alimentos demonstrou a possibilidade de aplicações comerciais para melhorar a segurança de frutos do mar e reduzir os riscos de criptosporidiose à saúde pública.

2.7 Diagnóstico

Para o diagnóstico da criptosporidiose métodos microscópicos, imunológicos e moleculares são utilizados; cada um apresenta determinada finalidade assim tendo vantagens e desvantagens. Para a escolha do método diagnóstico, devem ser considerados vários fatores como: a simplicidade de execução da técnica; a facilidade de interpretação dos resultados; os equipamentos necessários; os técnicos e seu nível de treinamento e de experiência dos mesmos; a quantidade de testes demandada; a rapidez da resposta; a sensibilidade e especificidade; a reprodutibilidade; as metodologias combinadas e os custos.

Os métodos utilizados para a análise de mariscos quanto a presença de protozoários como *Cryptosporidium*, são baseados naqueles originalmente projetados para analisar concentrados de água ou amostras fecais. A observação de resultados de diversas pesquisas comparando técnicas analíticas e os métodos de detecção utilizados por diferentes grupos de pesquisadores demonstra ainda não há um método específico e de uma ampla aceitação e também há divergência quanto ao material ou parte do molusco a ser investigada.

São utilizados desde lavagens e/ou homogeneizados de brânquias, do trato digestivo, de todo o corpo e hemolinfa. Embora a maioria dos pesquisadores concorde que homogeneizados de tecido forneçam a maior chance de recuperação de oocistos, como observado a partir de estudos em que mariscos foram artificialmente contaminados (FAYER et al 1997, TAMBURRINI e POZIO, 1999; MACRAE, 2005; MILLER et al, 2006) e naturalmente contaminados (LI et al, 2006; SCHETS et al., 2007).

2.7.1 Métodos Microscópicos

O objetivo deste método é a visualização dos oocistos em material suspeito, principalmente fezes de indivíduos com quadro sintomatológico da doença. O preparo prévio das amostras envolve a filtração para retirar o máximo de material orgânico, concentração por centrifugação e a ressuspensão destes oocistos em soluções saturadas para a aderência a lamínulas e observação em microscópio. A leitura da lâmina deve ser realizada logo após a flutuação em solução saturada, oocistos são observados levemente róseos, pois com o passar do tempo começam a deformar.

São utilizadas várias técnicas de coloração para a visualização dos oocistos dentre estas: Ziehl-Neelsen modificado (ácido-resistente), dimetil sulfóxido (DMSO) com carbol-fucsina, coloração a quente de safranina com azul de metileno, coloração modificada de Kohn, coloração modificada de Koster e auramina. Estas técnicas coram os oocistos em vermelho e um corante de contraste é utilizado para fundo (O'DONOGHUE, 1995; FAYER et al., 2000; ALMEIDA, 2004; JEX et al., 2008).

Em adição a estas técnicas de coloração direta, há também métodos de coloração negativa, que usam produtos químicos tais como a negrosina, verde brilhante e verde malaquita que coram o material de fundo das lâminas e os oocistos de *Cryptosporidium* sp. não se coram. Porém, a coloração diferencial tem sensibilidade e especificidade variável (FAYER et al., 2000; JEX et al., 2008). Uma grande variedade de corantes fluorocromos foram testados embora sensíveis, são complexos e algumas estruturas semelhantes a oocistos frequentemente absorvem o corante e necessitam ser verificados por outras técnicas (O'DONOGHUE, 1995; FAYER et al., 2000).

2.7.2 Métodos Imunológicos

A detecção de antígenos de *Cryptosporidium* em amostras fecais é uma abordagem diagnóstica aliada à visualização e identificação através da microscopia de fluorescência. A técnica Imunofluorescência Direta (Direct Fluorescent Antibody - DFA) demonstrou elevada especificidade (96-100%) e sensibilidade (98,5-100%) na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em esfregaços fecais e amostras ambientais (GRACZYK al. de 1996; SMITH, et al., 2003).

Imunoensaio como o teste ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) e o teste Imunocromatografia (IC) (NEWMAN et al., 1993; GARCIA; SHIMIZU, 1997), demonstraram especificidade elevada (98-100%), porém a sensibilidade da detecção dos antígenos pode ser menor do que a maioria das abordagens microscópicas (GARCIA; SHIMIZU, 2000; JOHNSTON et al., 2003).

Foram eficazes na detecção de *Cryptosporidium* em tecidos de moluscos as técnicas Imunofluorescência direta (DFA), a separação imunomagnética (Immunomagnetic Separation - IMS) em combinação com DFA, e a técnica da PCR. A técnica mais sensível foi IMS com DFA sendo capaz de recuperar 10 oocistos na glândula digestiva dos moluscos (MILLER et al., 2005).

Embora a IMS, tal como desenvolvida para a análise de amostra de água concentrada, tenha sido utilizada em algumas pesquisas sobre moluscos, os resultados e conclusões foram um tanto contraditórios. Enquanto Miller e colaboradores (2006) consideraram a técnica de concentração IMS seguida pelo teste de Imunofluorescência Indireta (Indirect Immunofluorescent - IFI) uma metodologia sensível para o processamento e detecção (comparadas a várias técnicas de detecção molecular) de *Cryptosporidium* spp. em mexilhões; MacRae et al (2005) concluíram que a qualidade da técnica IMS para isolar oocistos de *Cryptosporidium* de homogeneizados de mexilhões foi comprometida pela característica mucóide dos tecidos, mas apresentou um melhor desempenho com ostras.

Outro grupo de pesquisa considerou que os resultados da IMS foram tão negativos em suas análises de homogeneizado de tecido de ostra para oocistos de *Cryptosporidium* e *Giardia*, que interromperam o uso desta técnica (SCHETS et al., 2007).

O método de digestão da pepsina foi testado quanto a recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de moluscos bivalves. A detecção dos protozoários foi realizada pelo teste de imunofluorescência e o exame de 3g de homogeneizado dos mexilhões permitiu a recuperação entre 70 e 80% destes protozoários. A ocorrência relativamente alta, em comparação com outras pesquisas, pode ser devido à maior eficiência do novo método quanto a recuperação dos oocistos e ao maior número de amostras (ROBERTSON e GJERDE, 2008).

Existem vantagens e desvantagens associadas a cada uma das técnicas. O Teste de Imunofluorescência Indireta (IFAT) provavelmente possibilita detectar várias das espécies de *Cryptosporidium*, inclusive oocistos inviáveis, embora a adição de corantes fluorogênicos seja fundamental e outros métodos microscópicos possam informar sobre o conteúdo e a

viabilidade do parasita (FREIRE-SANTOS et al., 2002; SMITH et al., 2002). Entretanto, a microscopia de imunofluorescência é trabalhosa, subjetiva e requer uma alta habilidade do microscopista. Embora as técnicas moleculares possam ter um custo maior, estas não são subjetivas e a caracterização após a PCR permite a identificação das espécies ou genótipos do protozoário presentes em amostras (GÓMEZ-COUZO et al, 2004).

2.7.3 Métodos Moleculares

Os estudos que desenvolveram novas técnicas de biologia molecular e a comparação da sua eficácia quanto à recuperação de protozoários com a das demais técnicas, permitiu a obtenção de diagnósticos mais precisos em materiais ou amostras contendo quantidades pequenas do parasita.

Estudos publicados na Espanha até o ano 2000 basicamente utilizavam apenas coloração após métodos microscópicos para a detecção de *Cryptosporidium* e portanto, as espécies envolvidas não poderiam ser determinadas, embora geralmente eram associadas a espécie *C. parvum*. A disponibilidade e o uso de técnicas moleculares em estudos subsequentes têm demonstrado a existência de diversas espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em amostras ambientais e de origem animal (MARTINEZ et al, 2011).

Existem diversos tipos de técnicas para a identificação das espécies e/ou genótipos de parasitas como *Cryptosporidium* baseadas no estudo dos ácidos nucléicos que incluem várias formas de detecção e diferenciações como, a Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction-PCR), Nested PCR, PCR da Transcriptase Reversa (Reverse Transcription PCR), PCR em Tempo Real (Real time PCR) dentre outras.

Com o intuito de estabelecer novos protocolos e avaliar a aplicação na identificação e caracterização de *Cryptosporidium* spp. em moluscos, Gomez couzo et al (2004) compararam a eficácia da técnica da PCR em moluscos cujos oocistos haviam sido detectados anteriormente por microscopia usando a imunofluorescência. Quando comparadas as técnicas para a detecção de *Cryptosporidium* concluíram haver uma significativa associação entre os resultados obtidos a partir de ambas as técnicas. Resultados similares foram obtidos por Fayer et al. (2003), quando concluíram que nenhuma técnica foi melhor do que a outra em termos da capacidade para detectar *Cryptosporidium* em moluscos.

A aplicação dessas ferramentas moleculares levou a um melhor conhecimento e compreensão da sistemática, biologia, epidemiologia, ecologia e genética de populações de

espécies de *Cryptosporidium* (GASSER, 2006; SMITH et al., 2006; FAYER, 2008), melhorando estratégias para a prevenção, vigilância e controle da criptosporidiose no homem e em várias espécies de animais.

2.7.3.1 Genes, genótipos e subgenótipos de *Cryptosporidium*

A espécie *C. parvum* tem um genoma pequeno para um eucarioto (FAYER; XIAO, 2008). O tamanho do genoma foi estimado por Blunt et al. (1997) que encontraram um tamanho em torno de 10,4 Mb, com oito cromossomos, confirmado por análises dos cortes com enzimas de restrição (CACCIO et al., 1998).

Para a determinação de espécies, têm sido utilizadas regiões de baixa ou moderada variabilidade. Entre os genes de baixa variabilidade estão aqueles que codificam: o gene para a menor subunidade RNA ribossomal (*18SSU rRNA*); o codificante da proteína de parede de oocistos de *Cryptosporidium* (*COWP*), da proteína de choque térmico 70 kDa (*HSP-70*) ou o gene que codifica a actina (GASSER et al., 2003; XIAO; RYAN, 2004; JEX et al., 2008) (Tabela 2).

O gene codificante da menor subunidade RNA ribossomal (*18SSU rRNA*) é um marcador genético útil para identificação específica de *Cryptosporidium* spp., tendo uma variação de sequência relativamente baixa intraespecífica e alta interespecífica. Os genes *actina* e *HSP70* permitem a identificação em nível de espécie. Ambos marcadores têm sido utilizados juntos com o *18SSU rRNA* nas investigações sistemáticas (filogenéticas) de *Cryptosporidium* spp., fornecendo a base para a classificação atual dos membros dentro do gênero (JEX et al., 2008).

Entre as regiões de moderada variabilidade têm sido utilizados os genes da β -*tubulina*, genes *TRAP* (C1, C2 e C4) ou regiões intergênicas ITS-1 e ITS-2. Estas regiões são utilizadas tanto para estudos taxonômicos como de diagnóstico e epidemiologia, no entanto, essas regiões podem identificar espécies e alguns genótipos. A identificação de genótipos, subtipos ou linhagens, requer a utilização de regiões mais variáveis, tais como o gene para glicoproteína 60 kDa (*GP60*) e mini ou microssatélites como *ML1* e *ML2* (MARTINEZ et al., 2011).

Por outro lado, devido à necessidade em epidemiologia e saúde pública da caracterização de populações e subgenótipos dentro das diferentes espécies do gênero *Cryptosporidium*, tem sido utilizada a análise de múltiplos loci hipervariáveis (*MLT*,

multilocus typing). Desta forma, são criados padrões de *MLT* dependendo das combinações de genótipos para cada loci analisado (HUNTER et al, 2007). Estes estudos podem ser realizados através da detecção de diferenças no comprimento dos fragmentos amplificados (MLFT) em gel de agarose ou pelo seqüenciamento (MLST), permitindo o uso de marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism - Polimorfismo de nucleotídeo único), além de micro e minisatélites (XIAO, 2010).

O gene *COWP* apresenta alto grau de polimorfismo, gerando em torno de seis conjuntos de primers para a detecção das variações interespecíficas, permitindo sua utilização na diferenciação entre *C. parvum*, *C.meleagridis* e *C. hominis* (AMAR et al., 2004).

A escolha do gene alvo deverá ser feita mediante o objetivo da pesquisa, já que há diferenças entre a utilização de determinado gene e a resposta esperada. Para pesquisas de genotipagem é necessária a utilização de genes com “loci” conservados e posterior estudo filogenético. O gene mais utilizado para avaliar as seqüências de nucleotídeos é *SSU rRNA*, pois apresenta limitadas variações nas seqüências em diversas regiões do gene. Porém, se o objetivo da pesquisa é a determinação de subgenótipos, o uso de “loci” mais variáveis, como o gene hiper-variável da glicoproteína 60-kDa (*GP-60*) e o uso de microsatélites é recomendado para a identificação de espécies zoonóticas de *C. parvum* e *C. hominis* (FERGUSON et al., 2006).

O gene *GP-60* codifica uma proteína precursora das glicoproteínas de superfície celular gp45 e gp15, ambas envolvidas na formação dos esporozoítos e na invasão dos enterócitos (STRONG et al., 2000). Uma característica importante deste gene é o seu alto grau de polimorfismo. Em isolados de *C. hominis*, *C. parvum* e *C.meleagridis* numerosos subtipos foram identificados: sete subtipos de *C. hominis* (Ia-Ig); dois zoonóticos (IIa, IIc) e 10 não-zoonóticos (IIb, IIc, IIe-III) nos subtipos de *C. parvum* e seis subtipos de *C. meleagridis* (ABE et al, 2006;. AKIYOSHI et al, 2006;. GLABERMAN et al, 2001;. MEIRELES et al, 2006;. MISIC E ABE, 2007; SOBA E LOGAR, 2008).

Tabela 2 - Marcadores genéticos comumente usados para a classificação específica, genotípica ou subgenotípica de espécies de *Cryptosporidium* para aplicações tanto em diagnóstico, epidemiologia e genética de populações.

MARCADORES GENÉTICOS OU LOCUS	VARIABILIDADE	PROPRIEDADES DOS MARCADORES
Menor subunidade do RNA ribossomal nuclear (SSU rRNA)	Baixa	Identificação específica ou genotípica (Sistemática, diagnóstico e epidemiologia).
Gene 70 kDa proteína de choque térmico (HSP 70)	Baixa	Identificação específica ou genotípica (Sistemática, diagnóstico e epidemiologia).
Gene Actina (Actin)	Baixa	Identificação específica ou genotípica (Sistemática, diagnóstico e epidemiologia).
Gene da proteína da parede do oocisto de <i>Cryptosporidium</i> (COWP)	Baixa	Identificação específica ou genotípica (Taxonomia, diagnóstico e epidemiologia).
Segundo espaçador interno transcrito do DNA ribossomal nuclear (ITS-2)	Moderado	Identificação específica e alguma caracterização subespecífica (Taxonomia, diagnóstico e epidemiologia)
Gene Trombospondina-relacionada à proteína de fixação (TRAP)	Moderado	Identificação específica ou genotípica (Sistemática, diagnóstico e epidemiologia).
Microssatélite Locus 1 (ML1)	Alta	Identificação genotípica e/ou subgenotípica (estudos epidemiológicos genética de população)
Microssatélite Locus 2 (ML2)	Alta	Identificação genotípica e/ou subgenotípica (estudos epidemiológicos genética de população)
Gene Glicoproteína 60 kDa (gp60)	Alta	Identificação genotípica e/ou subgenotípica (estudos epidemiológicos genética de população)

Fonte: Adaptado de Jex et al., 2008.

Dentro de cada subtipo há vários subgenótipos baseado principalmente no número de tri-nucleotídeos repetidos na codificação do aminoácido serina, como sugerido por Sulaiman et al. (2005). Cerca de 58 subgenótipos encontram-se descritos na literatura, no grupo zoonótico subtipo IIa de *C. parvum* foram descritos 45 subgenótipos enquanto no grupo subtipo IIId 13 subgenótipos foram identificados (PLUTZER e KARANIS, 2009). No entanto, alguns autores usam a nomenclatura subgenotípica *GP-60* modificada, tornando a comparação internacional mais complicada (JEX e GASSER, 2008).

A ocorrência de *Cryptosporidium parvum* em humanos e animais tem demonstrado evidências que ambos os ciclos zoonótico e antropozoonóticos podem estar envolvidos na infecção humana.

O uso de subtipos *GP-60* tem permitido a identificação de diferenças geográficas e temporais na transmissão de espécies de *Cryptosporidium* e uma melhor observação da importância para a saúde pública de outras espécies/genótipos e a frequência de infecção mista com genótipos ou subtipos (ALVES et al., 2003).

2.7.3.2 Extração de Ácido desoxirribonucléico (ADN ou DNA)

Antes da aplicação de técnicas de biologia molecular como a PCR, se faz necessário primeiramente o isolamento do DNA. Esta etapa é de grande relevância ao resultado da técnica já que a ação de alguns fatores interferentes podem alterar os resultados.

Especificamente ao se tratar de oocistos de *Cryptosporidium* com parede espessa, estes não rompem com facilidade, necessitando de métodos físicos e químicos para a ruptura e obtenção do DNA. A falha na ruptura dos oocistos durante a extração pode impedir a liberação do DNA e a sua adsorção por compostos presentes nas amostras configuram problemas a serem superados pelos métodos de extração (SCORZA et al., 2003).

Os protocolos mais utilizados para promover a lise dos oocistos utilizam inúmeras combinações de técnicas, inserção e/ou retirada de certos reagentes, meios físicos como aplicação de ciclos de congelamento e descongelamento, por exemplo, usando nitrogênio líquido seguido de fervura do material contendo oocistos.

Inibidores, principalmente compostos orgânicos, presentes em amostras complexas, tais como fezes e solos, podem diminuir a sensibilidade da PCR em até 1000 vezes (WARD e WANG, 2001). Foram desenvolvidos protocolos para melhorar o isolamento de ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas ou ambientais contendo todas as espécies de

Cryptosporidium, que de forma eficaz e consistente removem componentes inibitórios para o processo de amplificação enzimática (GASSER et al., 2006).

Um grande obstáculo quando se objetiva amplificar DNA é a presença de ácidos húmicos que diminuem a eficiência da PCR. Ao se acrescentar ao método de extração a substância “Supelite polimérica adsorvente”TM DAX-8, constatou-se a redução no teor de ácidos húmicos em amostras de água. O DAX-8 pode fornecer melhor eficiência à técnica já que através da remoção destes ácidos houve um aumento significativo na confiabilidade de resultados obtidos pela PCR em monitoramento ambiental (SCHRIEWER et al, 2011).

Para a extração de DNA de moluscos estudos têm demonstrado que a utilização de métodos adaptados para amostras clínicas e água pode levar a obtenção de bons resultados (GOMEZ-COUSO et al, 2006). O método de Boom et al. (1990) utilizado para a extração de DNA de amostra fecal, após sofrer modificação como descrito por McLauchlin et al. (1999) foi utilizado com sucesso. Resumidamente, 200 µl de amostra foram mecanicamente separadas na presença de tiocianato de guanidina com pérolas ou contas de zircônia e o DNA foi purificado usando sílica ativada (GOMEZ-COUSO et al., 2006).

Adamska e colaboradores (2011) testaram a eficácia de kits comerciais para a extração de DNA de amostras contaminadas por *Cryptosporidium parvum*. A não obtenção inicialmente dos resultados esperados levou a aplicação de ciclos de banho nitrogênio/água antes das extrações. A eficácia da extração de DNA foi medida pela PCR e PCR tempo real CT. Os melhores resultados obtidos após a extração de DNA foram do protocolo de triplo banho nitrogênio/água em 100°C por 2 minutos e digestão com proteinase k.

2.7.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR

O princípio da técnica de PCR baseia-se na desnaturação de uma amostra de DNA de fita dupla através do aquecimento. Em seguida a temperatura é diminuída para permitir que seqüências conhecidas de oligonucleotídeos, chamados de iniciadores ou primers, realizem o anelamento nas seqüências complementares em fitas opostas do DNA molde. Em ambas as direções (3´_5´e 5´_3´) originando a síntese de DNA ao longo da fita. Esta reação é catalisada pela enzima termoestável DNA polimerase, obtendo-se ao final do processo duas fitas duplas de DNA. Os ciclos de temperatura necessários para que ocorram as reações normalmente são repetidos de 20 a 40 vezes através do uso de um termociclador automatizado. A reação é

fatorial de forma que ao final do processo existem milhões de cópias do DNA molde (GASSER, 2006).

A técnica da PCR é recomendada quando há pequena quantidade de oocistos, como em amostras de fezes, tecidos e outros tipos de materiais (por exemplo, bile) colhidos durante endoscopia. A PCR melhora a sensibilidade de detecção, e permite diferenciar espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. (CHALMERS; DAVIES, 2010).

Embora a técnica PCR seja rápida e altamente sensível, apresenta limitações como, por exemplo, resultados falso-positivos devido à detecção de ácidos nucléicos livres oriundos de outros microrganismos ou até mesmo de contaminação laboratorial. Portanto, contaminantes ambientais podem interferir nos ensaios qualitativos e/ou quantitativos (FAYER et al., 2000).

A técnica da Nested-PCR é um método sensível no qual o produto amplificado (amplicon) na primeira PCR, é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando um conjunto de iniciadores homólogos a sequências internas do segmento amplificado. O segundo par de iniciadores usados sempre amplifica uma sequência menor do que o primeiro par. Este procedimento torna a reação da PCR mais específica e sensível (ALMEIDA, 2004; HUBER, 2007; OSAKI, 2009). O uso desta técnica torna-se especialmente importante quando se necessita de alta sensibilidade para detectar poucos organismos contidos em amostras ambientais ou provenientes de animais com elevado grau de interferentes.

2.7.4 Sequenciamento e Filogenia

A maioria das técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico para *Cryptosporidium* spp. inclui uma etapa final de sequenciamento, para a identificação da espécie estudada.

O sequenciamento é fundamental quando as demais técnicas deixarem dúvidas quanto à identificação correta da espécie envolvida, sendo possível verificar diferenças genéticas interespecíficas (XIAO et al., 2000). Entretanto, o sequenciamento direto de DNA pode ter algumas limitações, por exemplo, a quantidades de DNA genômico amplificado. No caso de amostras contendo poucos oocistos de *Cryptosporidium* conseqüentemente as baixas concentrações de DNA podem resultar na má qualidade do sequenciamento. Nesse caso, amplicons devem ser obtidos a partir de um isolado representativo de uma população de oocistos significativa (FAYER e XIAO, 2008).

Análises filogenéticas de *Cryptosporidium* spp. usando os loci do *SSU rRNA*, *HSP-70* e *actina*, suportam a estrutura genética geral do gênero, com as espécies gástricas e as intestinais formando grupos monofiléticos distintos. As espécies e os genótipos formam dois grupos: o intestinal e o gástrico. Cada um dos grupos contém parasito de mamíferos, aves e répteis. O local de parasitismo em peixes ainda não é claro. Muitos genótipos relatados nos últimos anos foram redescritos como espécie (RYAN, 2009).

A nomeação de genótipos ocorre após a análise filogenética ter eliminado a possibilidade das diferenças serem devido à heterogeneidade entre as cópias do gene, ou variação intragenotípica.

2.8 Tratamento e Profilaxia

Muitas substâncias terapêuticas têm sido testadas contra *Cryptosporidium* spp. incluindo antibióticos, antiparasitários e antivirais. Algumas drogas como halofuginona e decoquinato apresentaram efeitos promissores. Estudos mostraram significativa redução na excreção de oocisto e diminuição na diarreia em bezerros, prevenindo a mortalidade. O decoquinato aumentou a média de ganho de peso diário de bezerros (SCHNYDER et al., 2009).

A paromomicina e depois nitazoxanida surgiram como drogas promissoras para o tratamento de criptosporidiose. A paromomicina foi a primeira droga testada em humanos para tratar diarreia por *Cryptosporidium* spp., mas ainda não teve sua eficácia comprovada não sendo aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA). Estudos em pacientes com AIDS com criptosporidiose mostraram que a paromomicina melhorou tanto os parâmetros clínicos quanto parasitológicos (DOWNEY et al., 2008; ROSSIGNOL, 2010). A nitazoxanida foi desenvolvida para tratar criptosporidiose em crianças e adultos imunocompetentes, por ter demonstrado atividade em reduzir a duração da diarreia e eliminação de oocistos em vários estudos (ROSSIGNOL, 2010). No entanto, a eficácia de nitaxozanida para tratamento de infecção por *Cryptosporidium* sp. em pacientes imunocomprometidos não foi confirmada (DOWNEY et al., 2008).

Boehmer et al. (2009) utilizaram a nitazoxanida como agente terapêutico em humanos com criptosporidiose e evidenciaram uma resposta clínica em 67% dos pacientes. Outra droga estudada é o pamoato de pirvinium que inibiu o crescimento de *C. parvum* tanto em cultivo de células “*in vitro*” quanto em ratos recém-nascidos. Os autores acreditam que é uma

droga candidata ao tratamento de criptosporidiose em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos.

Shahiduzzaman et al. (2009), avaliaram a eficácia de monensina, halofuginona e miltefosina no crescimento de *C. parvum*. A monensina e a halofuginona mostraram-se eficazes contra *C. parvum*, já a miltefosina mostrou atividade inibitória sob condições *in vitro*, embora com menor eficácia que as demais.

A terapia com antiretroviral provou ser mais eficaz na terapia por reduzir a frequência e severidade desta doença em pacientes com HIV. Estes efeitos foram atribuídos a recuperação da imunidade do hospedeiro como demonstrado em outros casos de criptosporidiose associado com outras causas de imunodeficiência tais transplante de órgãos, câncer, diabetes e má nutrição para os quais a terapia antiretroviral não é indicada (ROSSIGNOL, 2010).

Em animais já foram usadas diversas drogas terapêuticas, como: cloranfenicol, lincomicina, neomicina, nistatina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim, estreptomicina, metronidazol, ivermectin, entre outras, porém sem sucesso (AMARANTE, 1992).

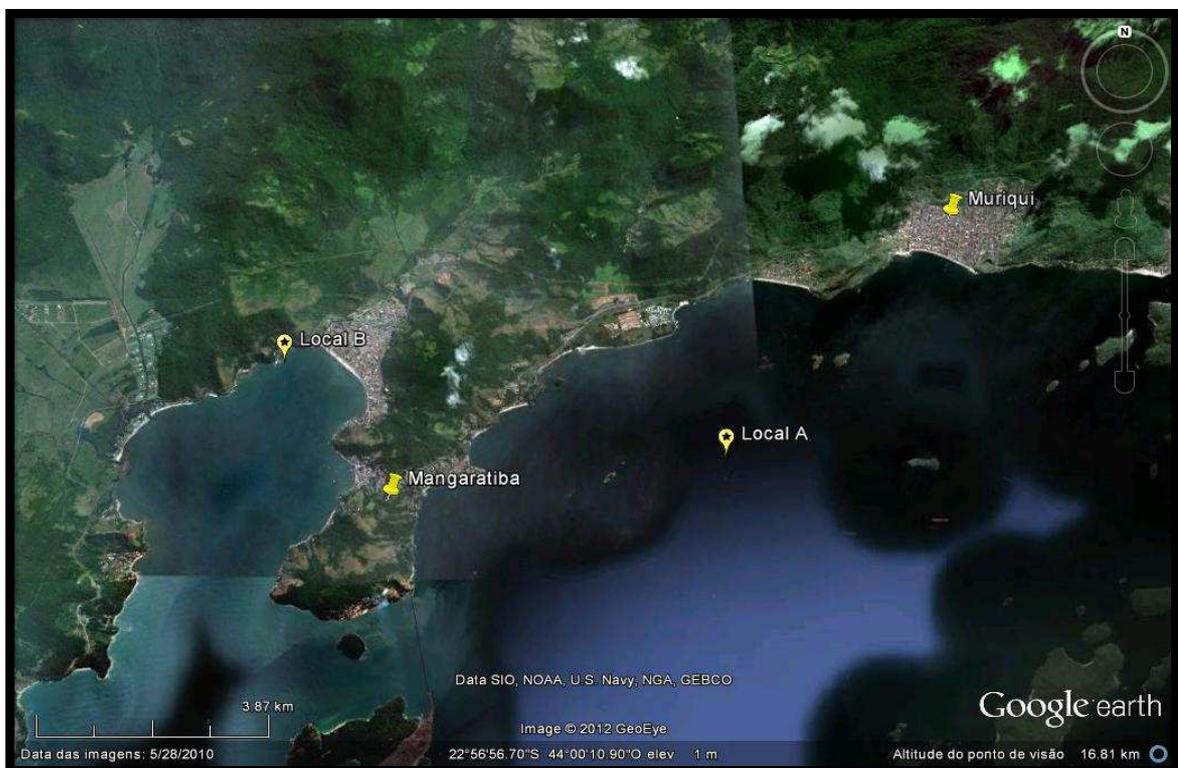
Como um eficaz método de tratamento para *Cryptosporidium* sp. ainda não foi seguramente determinado, medidas profiláticas para a redução de riscos de contaminação se tornam fundamentais. Medidas simples de higiene pessoal como a lavagem das mãos antes de comer ou preparar alimentos; após ir ao banheiro, a troca de fraldas e contato com animais entre outros, reduzem consideravelmente o risco de infecções. Cuidados na alimentação como lavagem de frutas e vegetais antes do consumo também são importantes formas de prevenção. Outro fator crucial é o adequado tratamento da água e do esgoto, tanto doméstico quanto industrial.

O tratamento da criptosporidiose em qualquer hospedeiro se restringe a estudos experimentais, até o momento não existem drogas específicas comercializadas. Em um hospedeiro com sintomatologia clínica da criptosporidiose, é preconizada a reposição de fluidos e eletrólitos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Locais de Coleta das Amostras

As coletas foram realizadas em dois locais no Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. Estes são constituídos por rochas naturais banhadas pela água do mar aonde previamente foi observada a presença de mexilhões *Perna perna*, alvos deste estudo (Figura 4).



Fonte: Adaptado do Google Earth (2011).

Figura 4: Imagem de satélite do Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro, indicando os locais de coleta. Local A- Laje Preta; Local B - praia do Saco.

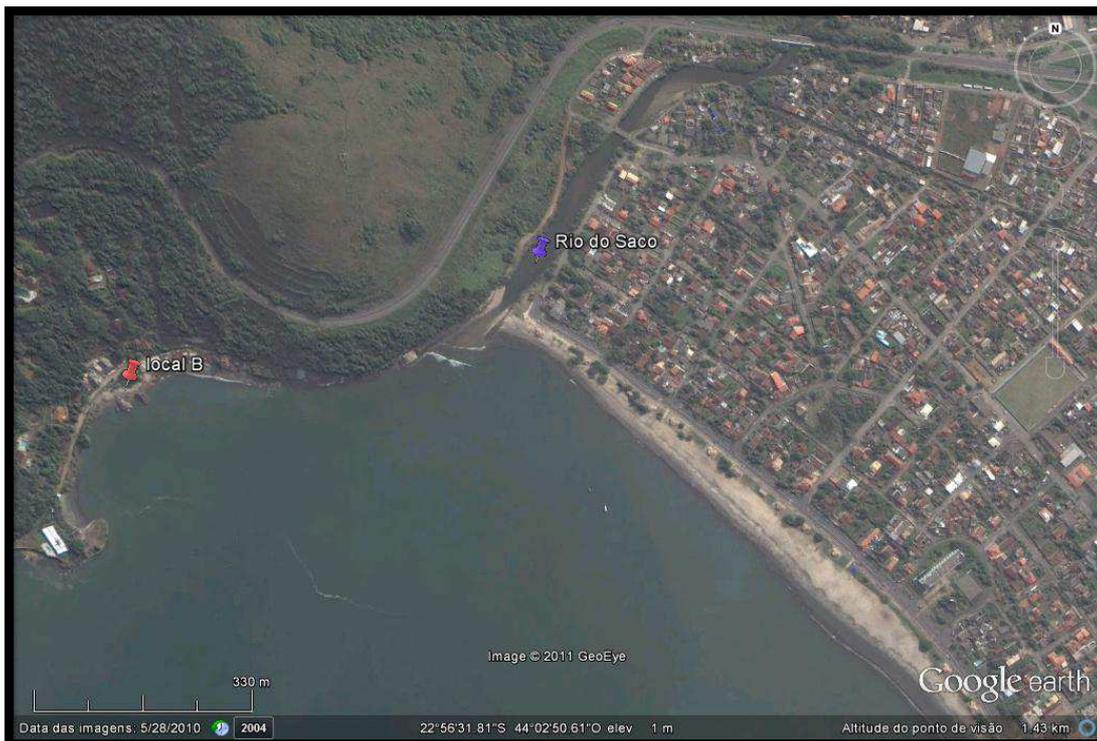
O local A é constituído por uma laje, que por definição é uma formação rochosa parcialmente emersa, e está localizada a 4,5 km da praia de Muriqui no município de Mangaratiba (Carta Náutica - MARINHA DO BRASIL, 2011). Há uma intensa corrente marinha banhando esta laje, ou seja, água do oceano passando pelo conjunto de rochas (Figura 5). Outro motivo que levou a escolha deste local foi que, segundo informações

cedidas pela Prefeitura Municipal de Mangaratiba, muitos pescadores extraem mexilhões destas rochas para comercialização ou para o próprio consumo.



Figura 5: Local A – Laje Preta – Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro.

O outro local alvo da pesquisa foi a praia do Saco. Este local foi escolhido por diversos motivos. Primeiramente devido à observação da presença de uma formação rochosa na praia contendo mexilhões e que, segundo informação dos próprios moradores, retiravam os animais para o consumo. Foi observado um rio desaguando muito próximo a praia, provavelmente contendo esgoto doméstico da área residencial e comercial que compõem o bairro Guití, indicando desta forma possível presença de patógenos nesse ambiente, como *Cryptosporidium*, alvo desta pesquisa. A este motivo somam-se as características geográficas da região desta praia, com formato de uma bolsa ou um “saco”, dificultando a renovação da água do mar pelas correntes marinhas, o que pode levar a concentração de poluentes e patógenos. Este local foi denominado Local B (Figuras 6 e 7).



Fonte: Adaptado do Google Earth (2011).

Figura 6: Imagem de satélite indicando a proximidade do local B, com o rio do Saco desaguando no mar. A esquerda observa-se elevada densidade demográfica. Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro.

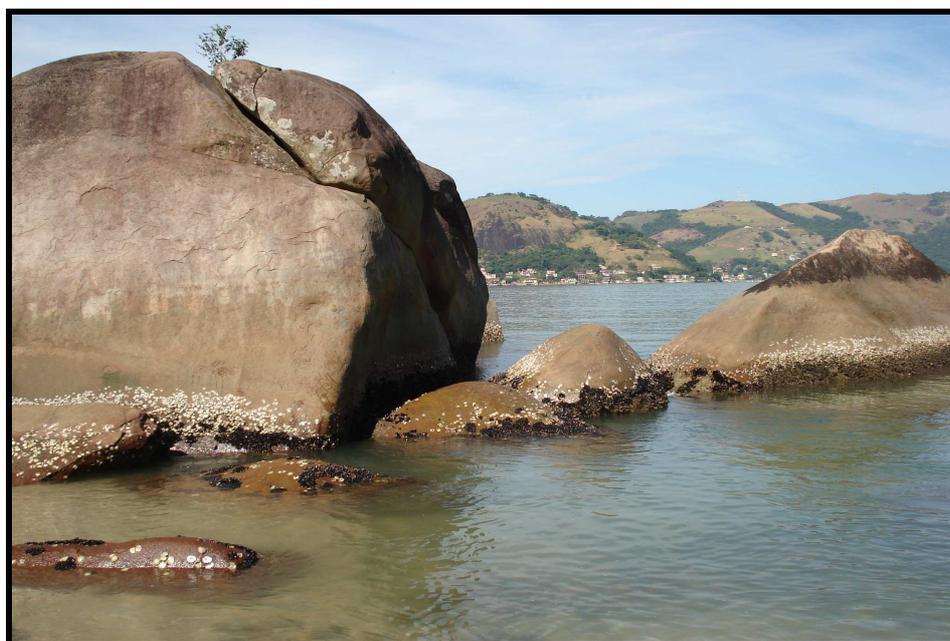


Figura 7: Local B – Praia do Saco – Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro.

Durante o ano de coleta desta pesquisa, foram observados nos dois locais estudados, sinais de extração de mexilhões por parte de pescadores; como seguimentos das rochas que estavam sem animais e que anteriormente eram observados muitos animais em idade de abate. Inclusive, em uma das coletas foi encontrado um pescador no momento da extração, retirando um grande volume de mexilhões *Perna perna* que seriam destinados tanto a comercialização para restaurantes da região quanto ao próprio consumo.

3.2 Amostragem

3.2.1 Mexilhões *Perna perna*

Durante os 12 meses de estudo, de março de 2009 a fevereiro de 2010, foram realizadas coletas mensais. Somente os indivíduos adultos com média de 6 cm de comprimento da valva, considerados em tamanho de abate segundo Avelar (1998) foram utilizados (figura 8). Em cada coleta os mexilhões foram retirados 30 animais de cada local e divididos em três grupos com 10 animais cada. A cada grupo de 10 animais foi formada uma amostra (figura 9).



Figura 8: Mexilhões *Perna perna* em tamanho de abate separados no laboratório, medindo em média 6 cm de comprimento.

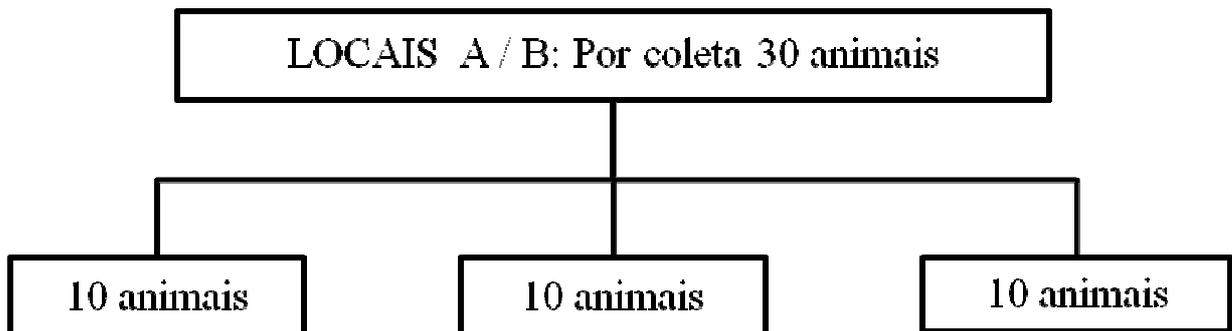


Figura 9: Organograma indicando a formação das amostras dos locais A e B.

Foram obtidas seis amostras por coleta, totalizando 72 amostras ao final das 12 coletas mensais, 36 amostras de cada local. As amostras do local A foram denominadas A1, A2 e A3 e as originadas do local B: B1, B2 e B3.

Os animais foram transportados resfriados em caixas isotérmicas e imediatamente processados ao chegar ao laboratório.

3.2.2 Dissecção e preparo das Amostras

As amostras dos mexilhões foram preparadas como descrito por Gomez-Couso et al. (2003) com modificações. Resumidamente o preparo das amostras para a análise se baseia em: filtração por membrana, eluição e concentração.

Após os mexilhões serem retirados das valvas, foram cuidadosamente separadas as glândulas digestivas e as brânquias (Figura 10). Em seguida foi acrescentado um volume médio de 10 ml de água destilada e os tecidos foram triturados com mixer DMX – 431 (Dellar) cerca de 5 minutos, com interrupções, para o máximo de homogeneização em busca de uma solução o mais uniforme possível. A solução obtida foi filtrada duas vezes através de tamis de plástico descartáveis com gaze para reter ao máximo os resíduos dos tecidos, logo após, o líquido foi transferido para tubos de 15 ml e centrifugado a 402,48 xg durante 5 minutos. Decorrido este tempo, foi descartado o sobrenadante e acondicionado o precipitado em tubos estéreis de 2 ml com tampa de rosca e mantidos em refrigeração.



Figura 10: Imagem dos moluscos selecionados, após a retirada das valvas: A - 30 animais sem as valvas; B – mexilhão isolado para dissecação e C – separação parcial da glândula digestiva e brânquias.

3.3 Locais da Análise Laboratorial

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Protozoologia, localizado no Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os procedimentos como extração de DNA e as técnicas da PCR foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular pertencente ao mesmo Departamento e Universidade citados acima. O sequenciamento das amostras positivas foi efetuado pela empresa coreana MACROGEN.

3.4 Extração de DNA das Amostras

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo segundo Huber et al. (2007). Cerca de 200 µl de suspensão dos mexilhões foram transferidos para microtubo de 1,5 ml contendo aproximadamente 0,2g de pérolas de vidro com 420 a 600 micrometros de diâmetro (Sigma®). Ao tubo foram adicionados 500µl de DNAzol ® (Invitrogen) e 70 µl de solução de polivinilpirrolidona (PVP) a 0,5% (Sigma).

Os microtubos foram agitados três vezes em vórtex, cada vez durante dois minutos e mantidos a 96° C por 60 minutos em termobloco. Posteriormente, foram centrifugados por 20 minutos e o sobrenadante transferido para outro microtubo de 1,5 ml, em seguida acrescentado 1000 µl de etanol absoluto e centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e ao pellet formado foi adicionado 500µl etanol 95% e levado a centrífuga durante 5 minutos. Este procedimento foi realizado duas vezes sem desprezar o primeiro volume. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi resuspenso em 500µl de DNAzol, centrifugado e transferido para novo microtubo. O DNA foi precipitado com etanol absoluto e a lavagem foi repetida, sendo o sedimento resultante resuspenso em 100 µl de tampão Tris-EDTA (TE). Os microtubos contendo o DNA foram mantidos a – 20° C até serem utilizados.

Para a realização da PCR cada amostra sofreu duas diluições, por 10 vezes e 100 vezes, no intuito de reduzir possíveis inibidores que impedisse a ocorrência da reação.

3.5 Realização da PCR e Nested-PCR

A PCR foi realizada utilizando-se um par de iniciadores genérico para *Cryptosporidium* spp. (XIAO et al., 1999) da região hiper-variada do gene *18SSU rRNA*. Este conjunto de iniciadores amplifica uma região de 1325 pares de base pela reação da PCR e de 826 a 864 pares de base pela Nested-PCR (Tabela 3). Os componentes utilizados na técnica da PCR e as condições de amplificação são indicados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 3 - Iniciadores usados nas técnicas da PCR e Nested-PCR para identificação da presença do gene *18SSU rRNA* de espécies de *Cryptosporidium* nas amostras de mexilhões *Perna perna*.

INICIADORES OU PRIMERS	REGIÃO GÊNICA	SEQUÊNCIA 5'-3'	FRAGMENTO AMPLIFICADO
PCR Forward (F)	18SSU rRNA	5'-TTCTAGAGCTAATACATCCG-3'	1325 pb
PCR Reverse (R)		5'-CCCATTTCCTTCGAAACAGGA-3'	
Nested-PCR (F)	18SSU rRNA	5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'	826 a 864 pb
Nested-PCR (R)		5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'	

Tabela 4 - Componentes com as respectivas concentrações utilizados na técnica PCR para a amplificação do gene *18SSU rRNA* de espécies de *Cryptosporidium* nas amostras de mexilhões *Perna perna*.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE	CONCENTRAÇÃO DE USO
Água ultrapura	*qsp	qsp
Tampão	10X	1X
MgCl ₂	50 mM	4 mM
dNTP	10 mM	200 µM
Primer F e Primer R	10 pmol/µL	0,2 µM (cada)
Taq Platinum Polimerase	5 U/µL	1,0 U
DNA	_____	_____
Volume total	_____	_____

*qsp= quantidade suficiente para

Tabela 5 - Condições da amplificação dos iniciadores utilizados na técnica PCR para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. em mexilhões *Perna perna*.

NÚMEROS DE CICLOS	TEMPERATURA/TEMPO
1 Ciclo	94°C / 3 minutos
35 Ciclos	94°C / 45 segundos
	55°C / 45 segundos
	72°C / 1 minuto
1 Ciclo	72°C / 7 minutos

Foram utilizadas as mesmas condições e componentes de amplificação na segunda reação Nested-PCR havendo somente a redução da concentração de MgCl₂ para 2mM.

A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf®) e os produtos da amplificação foram armazenados a 4°C até a realização da eletroforese em gel de agarose a 1,2%.

3.5.1 Controles Positivo e Negativo

Para avaliar os riscos de falso-positivos, falso-negativos ou contaminações foram usados controles. Para controle positivo utilizou-se amostra positiva através da microscopia e confirmada através do seqüenciamento, depositada no GenBank sob número de acesso DQ885333 (HUBER, 2007) como *Cryptosporidium parvum*. Para o controle negativo foram utilizadas as mesmas condições das reações, porém substituindo o DNA da amostra pelo mesmo volume de água ultrapura.

3.5.2 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram observados através de eletroforese em gel de agarose preparado a 1,2% em tampão TAE 1X (Tris base 89 mM, Ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM).

Foi utilizado 5 µl do marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen) e o volume de 10 µl da reação com 2 µl do corante azul de bromofenol para cada amostra. Após a aplicação no gel este foi submetido a corrente elétrica de 75 volts durante 45 minutos

numa cuba de eletroforese para a separação das bandas. Em seguida ao término das corridas o DNA contido nos géis foi corado com brometo de etídio e visualizado em fonte ultravioleta através do sistema de captura de imagem (Bio-Rad) e fotodocumentado.

3.6 Sequenciamento do Gene *SSUrRNA* e Análise Filogenética

Do total de amostras positivas dos dois locais de estudo, inclusive dentre as diluições, foi separada apenas uma das amostras, de acordo com a concentração e considerando a menor intensidade de bandas inespecíficas. A partir destas amostras foi realizada novamente a amplificação com o segundo par de primers da reação Nested-PCR na tentativa de se obter a concentração 50 ng/μl para o sequenciamento. Um total de 20 amostras foram amplificadas e estas foram purificadas com o Kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System e quantificadas através de espectrofotometria com o uso do equipamento Nanodrop.

O alinhamento das sequências e seus ajustes manuais foram feitos utilizando o programa Clustal W (LARKIN et al., 2007; GOUJON et al., 2010), as sequências foram analisadas através do software MEGA 5 (TAMURA et al., 2011).

Na plataforma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi realizada uma busca de todas as sequências obtidas através do sequenciamento dos espécimes utilizando o gene *SSUrRNA* para determinar suas identidades e possíveis homologias e similaridades com espécies previamente depositadas no GenBank.

Como teste filogenético foi realizado *bootstrap* com 1000 réplicas, das quais foram construídas as árvores consenso pelo método *Neighbor-Joining*, utilizando-se o algoritmo Kimura 2, para o gene alvo utilizado. As sequências obtidas no trabalho foram depositadas no GenBank.

3.7 Amostras positivas contendo *Cryptosporidium parvum*

As amostras sequenciadas e diagnosticadas como *Cryptosporidium parvum* foram submetidas ao estudo de outro gene alvo, o *GP60* (60 kDa glycoprotein). Os *primers* utilizados na reação da PCR foram AL 3531 (5'-ATA GTC TCC GCT GTA TTC-3' na direção *forward*) e AL 3534 (5'-GCA GAG GAA CCA GCA TC-3' na direção *reverse*), obtendo-se amplicons com aproximadamente 950 pb (PENG et al., 2003).

Para a Nested-PCR foram utilizados os *primers* AL 3532 (5`-TCC GCT GTA TTC TCA GCC-3' na direção *forward*) e LX 0029 (5' -CGA ACC ACA TTA CAA ATG AAG T-3' na direção *reverse*) (SULAIMAN et al., 2005).

As condições e concentrações para a realização da PCR primária e da Nested-PCR foram as mesmas descritas anteriormente para as reações com o gene *SSUrRNA*.

3.7.1 Sequenciamento a partir do Gene *GP 60*

Todos os procedimentos descritos para o sequenciamento e filogenia realizados nas amostras positivas para *Cryptosporidium* utilizando o gene *18SSUrRNA* conforme descrito acima, foram seguidos para este outro gene alvo *GP60*.

3.8 Análises Estatísticas

Foi realizada uma análise descritiva demonstrando a frequência relativa de amostras positivas, de ambos os locais A e B durante o ano de coleta.

Objetivando a comparação entre o número de amostras positivas entre os dois locais de coleta foi realizado o Teste Z para comparação de proporções.

Em busca de respostas sobre a possível associação entre os resultados positivos dos dois locais com o índice de pluviosidade; utilizou-se o teste qui-quadrado. O ano foi classificado de acordo com os dados de precipitação pluviométrica informados pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) em dois períodos, seco e chuvoso.

4. RESULTADOS

4.1 Diagnóstico através da Nested-PCR

Houve a amplificação de 20 das 72 amostras através da reação Nested-PCR em concentração suficiente para a visualização das bandas, a partir da eletroforese em gel de agarose.

Em onze dos 12 meses estudados foi diagnosticada amostras de mexilhões *Perna perna* positivas para *Cryptosporidium* pelo menos um dos locais estudados. As amostras do mês de Dezembro foram consideradas negativas (figura 13).

O local A apresentou amostras positivas durante os meses de Março, Maio, Julho, Agosto, Outubro, Novembro de 2009 e Janeiro de 2010; ou seja, em sete dos 12 meses estudados. Nos meses Março, Abril, Maio, Junho, Setembro, Outubro de 2009 e Fevereiro de 2010 foram diagnosticadas amostras positivas dos mexilhões coletados do local B; também em sete dos meses pesquisados (figuras 11, 12 e 13).

Nos meses de Março, Maio, Outubro e Novembro de 2009, as amostras de mexilhões dos dois locais de estudo estavam contaminadas por *Cryptosporidium*.

A proporção de positivos do local A em relação ao total de 36 amostras foi em torno de 30% enquanto do local B foi 25%. O p-valor foi 0,29 maior do que 0,05; demonstrando que não houve diferença significativa entre as proporções de amostras positivas entre os dois locais de coleta (tabela 06).

4.2 Amostras Sequenciadas

Do total de amostras positivas a partir do gene *18 SSU rRNA* dos dois locais do estudo, foram separadas amostras, de acordo com a concentração e considerando a menor intensidade de bandas inespecíficas, para serem enviadas ao sequenciamento (figura 14).

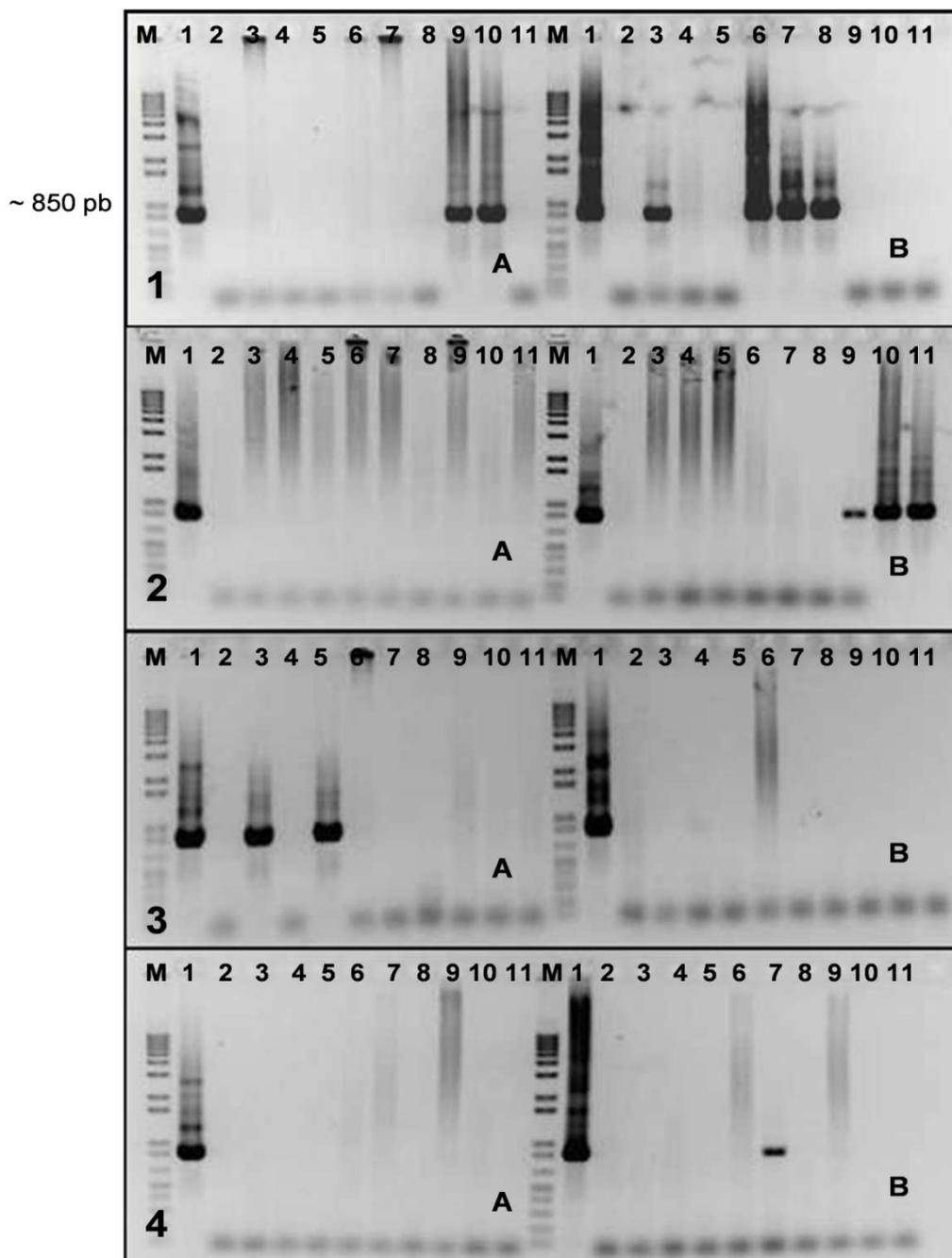


Figura 11: Amplificação pela Nested-PCR do gene *18SSU rRNA* de *Cryptosporidium* em mexilhões *Perna perna* oriundos do Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. 1) Março; 2) Abril; 3) Maio e 4) Junho. A: Lage Preta; B: Praia do Saco. M: marcador de peso molecular. Colunas 1: controles positivos; colunas 2: controles negativos; colunas 3 (amostras 1 sem diluir), 4 (amostras 1 diluições 10^{-1}), 5 (amostras 1 diluições 10^{-2}); 6 (amostras 2 sem diluir), 7 (amostras 2 diluições 10^{-1}), 8 (amostras 2 diluições 10^{-2}), 9 (amostras 3 sem diluir), 10 (amostras 3 diluições 10^{-1}) e 11 (amostras 3 diluições 10^{-2}).

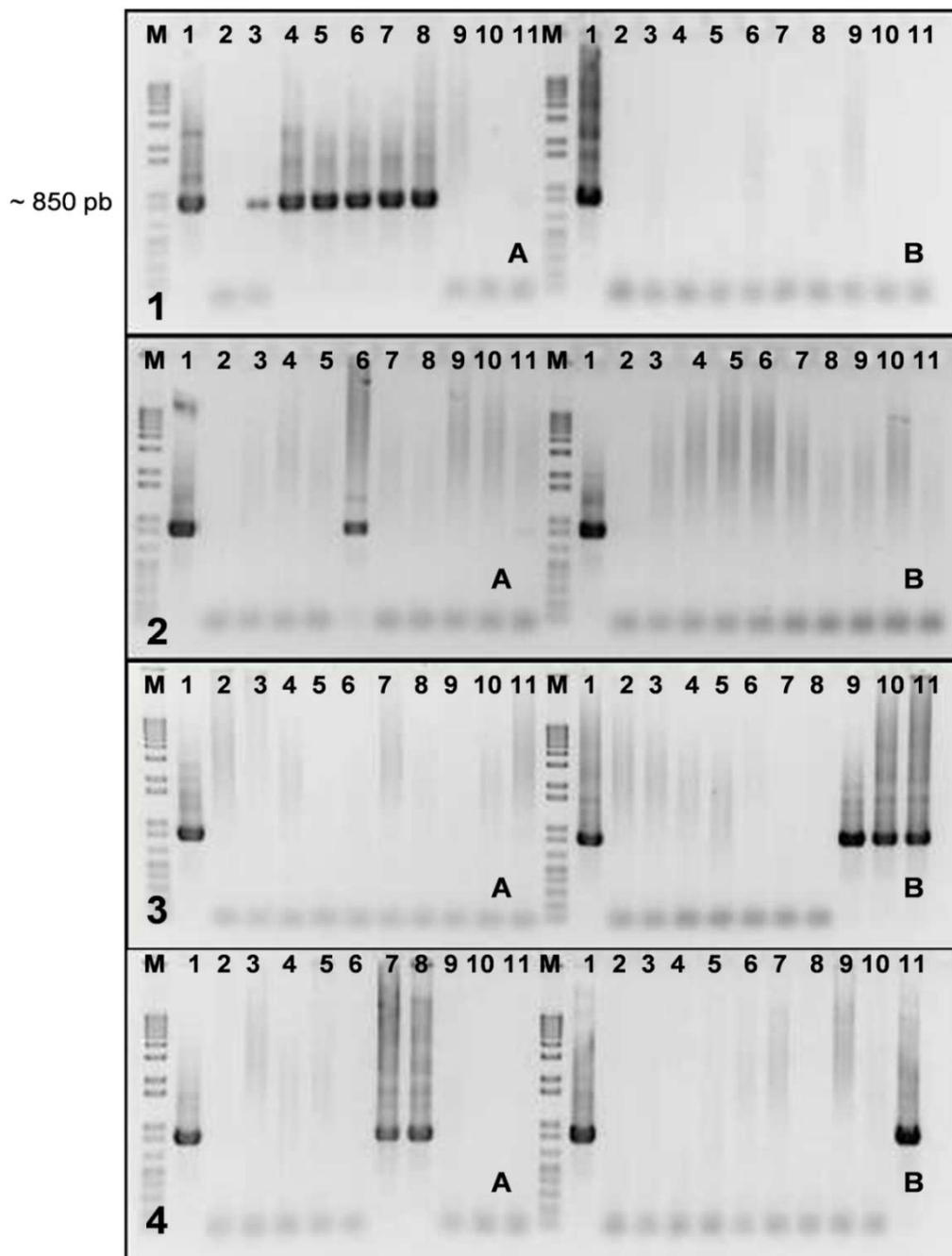


Figura 12: Amplificação pela Nested-PCR do gene *18SSU rRNA* de *Cryptosporidium* em mexilhões *Perna perna* oriundos do Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. 1) Julho 2) Agosto; 3) Setembro e 4) Outubro. A: Lage Preta; B: Praia do Saco. M: marcador de peso molecular. Colunas 1: controles positivos; colunas 2: controles negativos; colunas 3 (amostras 1 sem diluir), 4 (amostras 1 diluições 10^{-1}), 5 (amostras 1 diluições 10^{-2}); 6 (amostras 2 sem diluir), 7 (amostras 2 diluições 10^{-1}), 8 (amostras 2 diluições 10^{-2}), 9 (amostras 3 sem diluir), 10 (amostras 3 diluições 10^{-1}) e 11 (amostras 3 diluições 10^{-2}).

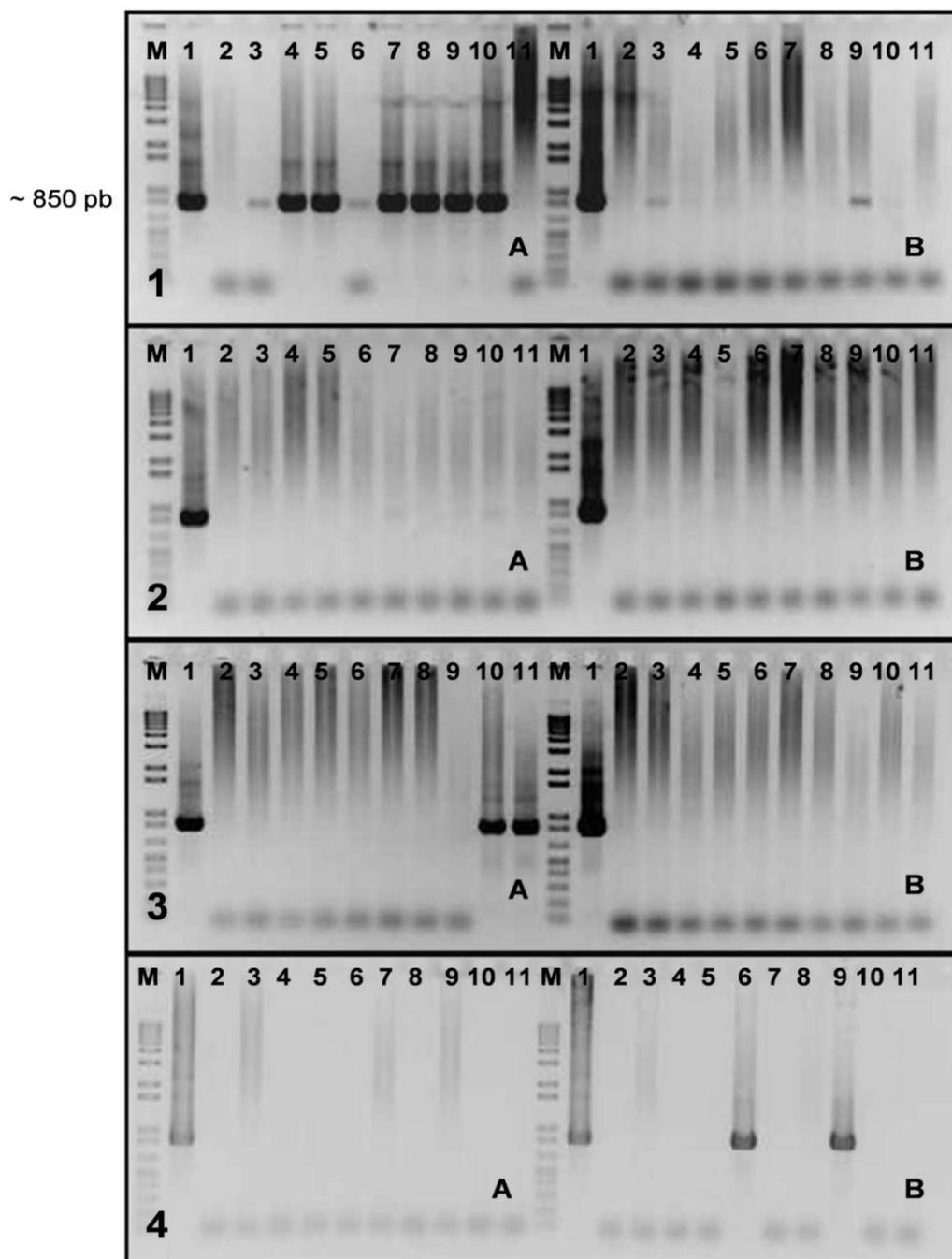


Figura 13: Amplificação pela Nested-PCR do gene *18SSU rRNA* de *Cryptosporidium* em mexilhões *Perna perna* oriundos do Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. 1) Novembro; 2) Dezembro; 3) Janeiro/2010 e 4) Fevereiro/2010. A: Lage Preta; B: Praia do Saco. M: marcador de peso molecular. Colunas 1: controles positivos; colunas 2: controles negativos; colunas 3 (amostras 1 sem diluir), 4 (amostras 1 diluições 10^{-1}), 5 (amostras 1 diluições 10^{-2}); 6 (amostras 2 sem diluir), 7 (amostras 2 diluições 10^{-1}), 8 (amostras 2 diluições 10^{-2}), 9 (amostras 3 sem diluir), 10 (amostras 3 diluições 10^{-1}) e 11 (amostras 3 diluições 10^{-2}).

Tabela 6 – Teste Z para proporções comparando o número de amostras positivas entre os locais de coleta de mexilhões *Perna perna* A e B.

	Local A	Local B
N	11	9
N	36*	36*
P	0,305556	0,25
Z	0,52725	
p-valor	0,29901	

Legenda: n = número de amostras positivas; N = número total de amostras; p = proporção entre n/N; z = estatística de proporção; p-valor = probabilidade de diferença entre as amostras dado um nível de significância de 5%. *N=36 pois não foram consideradas as diluições.

4.3. Sequenciamento e Filogenia

Foi possível a identificação de três espécies de *Cryptosporidium* nas amostras obtidas de mexilhões dos dois locais do estudo, A e B.

Através da observação da similaridade quando comparadas às sequências já existentes no GenBank. As amostras identificadas como: *C. meleagridis* apresentaram 97%; como *C. parvum* 99% e *C. andersoni* 100% de similaridade com as sequências utilizadas.

Para o alinhamento e filogenia foram consideradas 15 das 20 amostras sequenciadas. O alinhamento das sequências obtidas permitiu a observação de regiões de polimorfismo entre as espécies e dentro de cada espécie identificada.

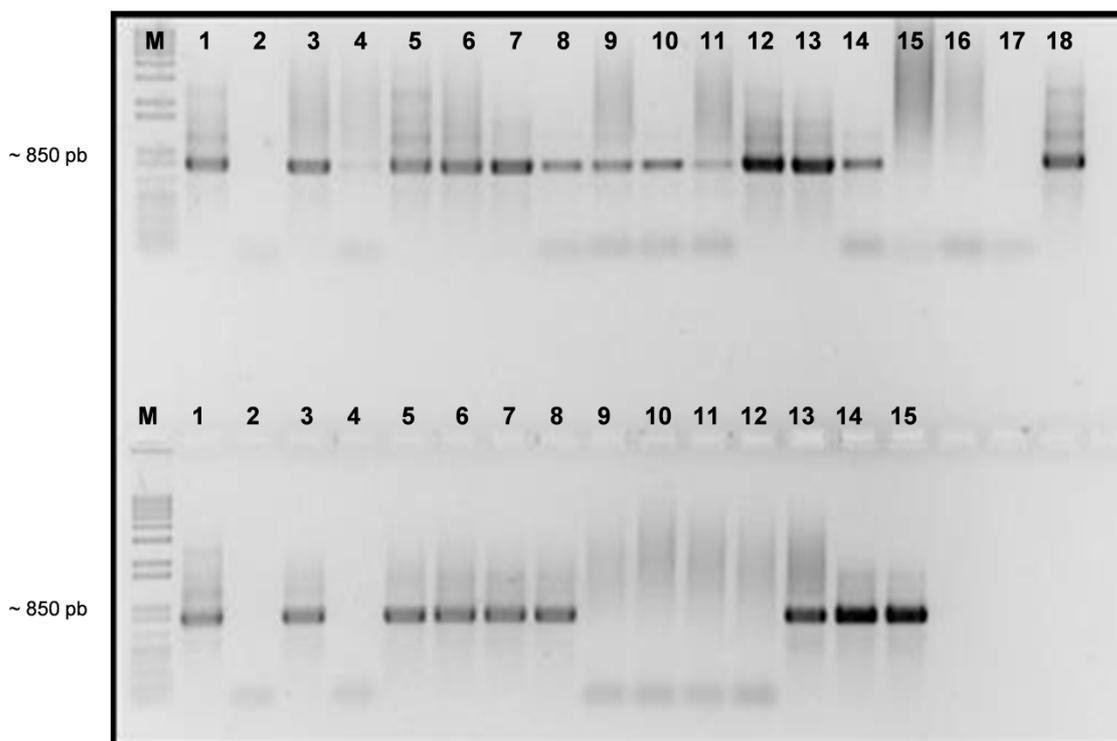


Figura 14: Foto do gel de eletroforese da reação Nested-PCR do gene *18SSU rRNA* de *Cryptosporidium* em mexilhões *Perna perna* dos dois locais de estudo A e B. Pente 1- M: Marcador (1 Kb Plus DNA Ladder); coluna 1: controle positivo; coluna 2: controle negativo; coluna 3: amostra A 1.3; 4: B 1.1; 5: B 1.2; 6: B 2.3 (10^{-1}); 7: A 3.1; 8: B 3.1(10^{-1}); 9: B 4.2 (10^{-1}); 10: A 5.1 (10^{-1}); 11: A 5.2 (10^{-1}); 12: A 5.3 (10^{-2}); 13: A 6.2; 14: B 7.3; 17: controle negativo e 18: controle positivo. Pente 2- M: Marcador (1 Kb Plus DNA Ladder); coluna 1: controle positivo; coluna 2: controle negativo; coluna 3: amostra A 8.2 (10^{-2}); 5: B 8.3 (10^{-2}); 6: A 9.1 (10^{-1}); 7: A 9.2 (10^{-1}); 8: A 9.3; 13: A 11.3 (10^{-1}); 14: B 12.2 e 15: B12.3.

Ao se analisar o alinhamento dos nucleotídios pode-se observar regiões de menor polimorfismo entre duas espécies, considerando *C. parvum* e *C.meleagridis*. Apenas a mudança de uma base foi percebida como região de polimorfismo entre as três espécies como indicado no Anexo A (48 a 50 bases). As espécies *C. parvum* e *C.meleagridis* possuem sequências muito próximas podendo ser diferenciadas apenas em determinadas regiões.

A região que abrange entre 446 a 554 bases do alinhamento entre as sequências, foi a que apresentou maior polimorfismo interespecífico, permitindo não somente a diferenciação entre as três espécies como também entre as duas espécies *C. parvum* e *C.meleagridis*.

Houve a mudança de bases em determinadas regiões das sequências das amostras 10 e 13 identificadas como *C. andersoni*, indicando polimorfismo intraespecífico. Estas mudanças podem ser resultantes de mutações ou de um erro da enzima Taq-polimerase na fase de extensão da fita de DNA (“escorregão” da Taq) ou ainda uma característica regional desta espécie já que não foi comparada com outras sequências brasileiras.

Na análise filogenética, todas as amostras sequenciadas agruparam-se às espécies correlatas já descritas. As amostras identificadas como *C. parvum* apresentaram similaridade de 99% com a sequência AF164102 do GenBank, como *C. meleagridis*, 97% de similaridade com a sequência AF164102 e como *C. andersoni*, 100% de similaridade com a sequência AY954885 (figura 15).

As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank e receberam os seguintes números de acesso: *C. meleagridis* JX141292, JX141293, JX141294; *C. parvum* JX141295, JX141296, JX141297, JX141298 e JX141299; e *C. andersoni* JX141300, JX141301, JX141302, JX141303, JX141304, JX141305 e JX141306 como indicados na figura 15.

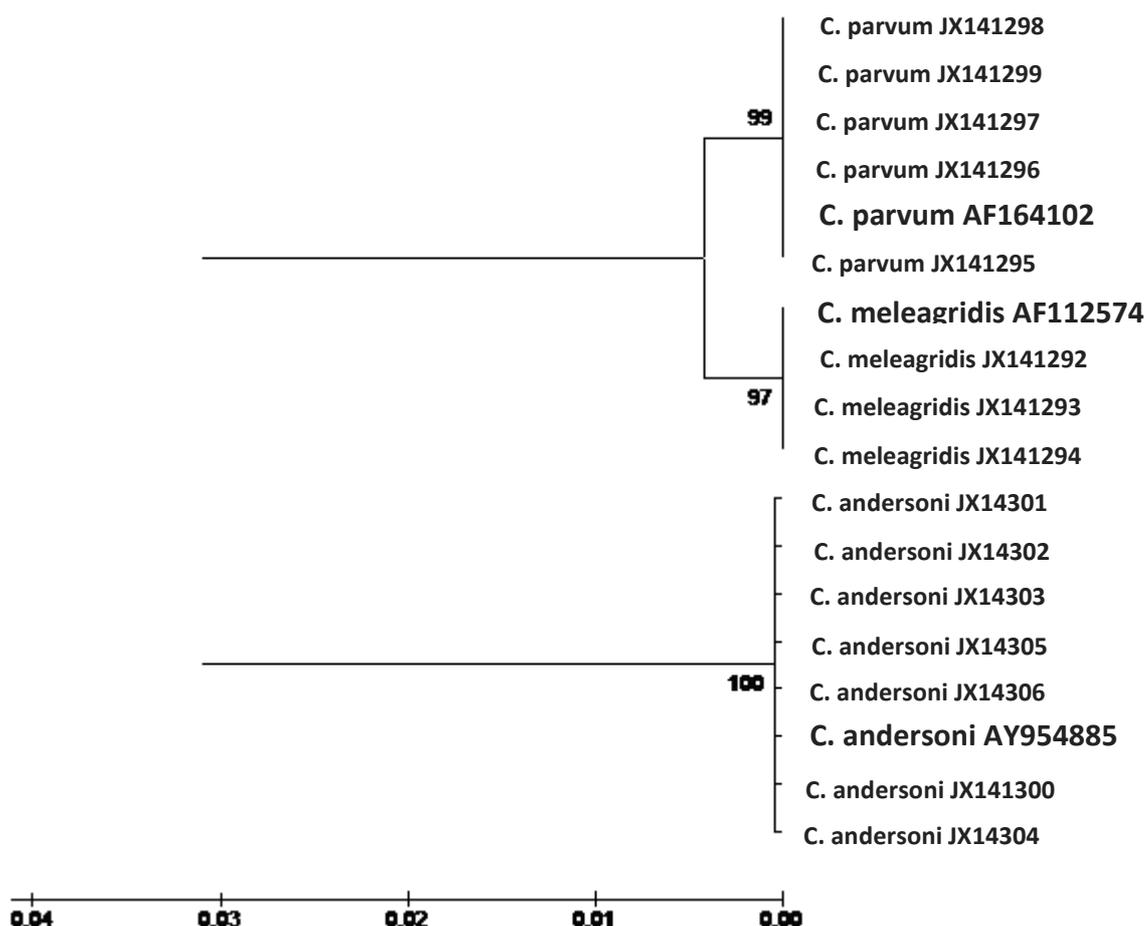


Figura 15: Árvore filogenética construída a partir do sequenciamento do gene *18S SSUrRNA* de espécimes de *Cryptosporidium* diagnosticadas em amostras de mexilhões *Perna perna* do Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. Números de acesso de cada sequência no GenBank. A análise utilizada na construção da árvore foi a *Neighbor-Joining* e os valores de *bootstrap* encontram-se acima de 97%.

As três espécies que foram diagnosticadas nos mexilhões coletados nos locais A e B ao longo do ano de estudo podem ser observadas na tabela 07. No mês de Março foram diagnosticadas as espécies *C. meleagridis* (local A) e *C. parvum* (local B), enquanto em Maio e Outubro, nos dois locais foi diagnosticada a espécie *C. andersoni*. Em Novembro as espécies *C. parvum* e *C. andersoni* foram diagnosticadas nos mexilhões oriundos do mesmo local (local A).

Na tabela 07 observa-se que de um total de sete coletas; durante os meses de março a setembro de 2009, não houve mensuração de precipitação pluviométrica, segundo o INMET, constituindo o período seco do ano. Enquanto que em um total de cinco coletas, nos meses de Outubro de 2009 a Fevereiro de 2010; constituíram o período chuvoso.

No período chuvoso, das 30 amostras analisadas foram detectadas cinco positivas do local A e três do local B; no período seco, das 42 analisadas, os resultados foram seis amostras positivas do local A e seis do local B.

O resultado da análise estatística da possível associação entre o período chuvoso e a presença de *Cryptosporidium* spp. no local A, através do teste Qui-quadrado, demonstrou não haver influência da presença ou ausência das chuvas na positividade das amostras ($X^2 0,111317 < X^2 \text{ tab. } 3,841459$). O mesmo pode-se concluir para o local B diante do resultado $X^2 1,12 < X^2 \text{ tab } 3,841459$.

Tabela 7 – Amostras positivas de mexilhões *Perna perna* para *Cryptosporidium*, dos dois locais de estudo A e B a partir das 12 coletas mensais. Espécies identificadas através do seqüenciamento genético (*18SSU rRNA*). Períodos anuais classificados entre seco e chuvoso de acordo com a precipitação pluviométrica.

AMOSTRAS	MÊS	ESPÉCIES	PRECIPITAÇÃO (mm)*	PERÍODO
A 1.3	Março/09	<i>C. meleagridis</i>	0	Seco
B 1.1	Março/09	<i>C. parvum</i>	0	Seco
B 1.2	Março/09	<i>C. parvum</i>	0	Seco
B 2.3	Abril/09	<i>C. meleagridis</i>	0	Seco
A 3.1	Maiio/09	<i>C. andersoni</i>	0	Seco
B 3.1	Maiio/09	<i>C. andersoni</i>	0	Seco
B 4.2	Junho/09	<i>C. parvum</i>	0	Seco
A 5.1	Julho/09	<i>C. andersoni</i>	0	Seco
A 5.2	Julho/09	<i>C. andersoni</i>	0	Seco
A 5.3	Julho/09	<i>C. andersoni</i>	0	Seco
A 6.2	Agosto/09	<i>C. andersoni</i>	0	Seco
B 7.3	Setembro/09	<i>C. andersoni</i>	0	Seco
A 8.2	Outubro/09	<i>C. andersoni</i>	19	Chuvoso
B 8.3	Outubro/09	<i>C. andersoni</i>	19	Chuvoso
A 9.1	Novembro/09	<i>C. parvum</i>	179,8	Chuvoso
A 9.2	Novembro/09	<i>C. parvum</i>	179,8	Chuvoso
A 9.3	Novembro/09	<i>C. andersoni</i>	179,8	Chuvoso
A 11.3	Janeiro/10	<i>C. meleagridis</i>	115,6	Chuvoso
B 12.2	Fevereiro/10	<i>C. parvum</i>	144,2	Chuvoso
B 12.3	Fevereiro/10	<i>C. parvum</i>	144,2	Chuvoso

Legenda: A 1.3; onde A= local A, 1= primeira coleta, 3= amostra 3 (constituída por 10 mexilhões). B 1.1; onde B= local B; 1= primeira coleta, 1= amostra 1 (constituída por 10 mexilhões). Fonte: *Os dados de precipitação pluviométrica e temperatura foram obtidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

4.4 Amostras positivas para *Cryptosporidium parvum*

As sete amostras que foram diagnosticadas como *Cryptosporidium parvum* a partir do gene *18 SSU rRNA* foram submetidas a amplificação através da reação Nested-PCR utilizando o gene alvo *GP60* (figura 16). Sendo que uma das amostras do mês de Novembro (A 9.3) diagnosticada como *C. andersoni* também foi analisada, pois o seu seqüenciamento demonstrou haver a sobreposição de bases e as outras duas amostras (A 9.1 e A9.2) do mesmo mês foram identificadas como *C. parvum*.

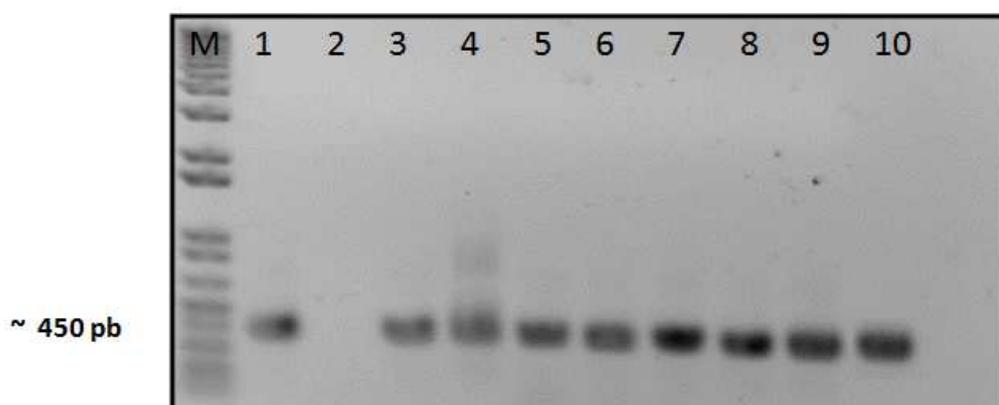


Figura 16: Foto do gel de eletroforese da reação Nested-PCR do gene *GP60* de *Cryptosporidium parvum* em mexilhões *Perna perna* dos dois locais de estudo A e B. M: Marcador (1 Kb Plus DNA Ladder); coluna 1: controle positivo; coluna 2: controle negativo; coluna 3: amostra B 1.1; 4: B 1.2; 5: B 4.2; 6: A 9.1; 7: A 9.2 (10^{-1}); 8: B 12.2; 9: B12.3 e 10: A 9.3.

5 DISCUSSÃO

Foi possível diagnosticar mexilhões positivos para o gênero *Cryptosporidium* em sete dos 12 meses de coletas dos dois locais A e B. Sendo encontrada em cinco meses de coleta a espécie *C. andersoni*, em dois meses a espécie *C. meleagridis* e em um mês foi encontrado *C. parvum* no local A. Enquanto para o local B, os resultados mostraram que em três meses a espécie identificada foi *C. andersoni*, em outros distintos três meses, *C. parvum* e em um mês *C. meleagridis*.

Apesar da prevalência de *C. andersoni* em mexilhões *Perna perna* ao longo do ano de estudo, a presença das espécies potencialmente zoonóticas *C. meleagridis* e *C. parvum* ainda que em três dos 12 meses confirma o risco do consumo dos mexilhões do local A. Os protozoários estão presente na água do mar que banha o costão rochoso de onde periodicamente são retirados os animais para o consumo humano. Desta forma os resultados dessa pesquisa indicam a possível utilização de mexilhões *Perna perna* como indicadores de contaminação ambiental.

A capacidade dos mexilhões acumularem os oocistos em seus tecidos também foi confirmada por outros autores, como Gómez-Bautista et al. (2000), que detectaram oocistos e cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp em bivalves destinados ao consumo humano na Espanha. Gomez-Couso e colaboradores (2003) encontraram oocistos de *Cryptosporidium* spp. viáveis em ostras comercializadas levantando o risco a saúde pública.

Pode-se observar que os órgãos separados para a realização das análises investigativas, brânquias e glândulas digestivas, foram capazes de concentrar o protozoário *Cryptosporidium* sendo indicados em casos que existam pequenas quantidades de patógenos. Estes resultados confirmam o que Gómez-Couso et al. (2005) encontraram quando infectaram experimentalmente amêijoas com *C. parvum* e investigaram a presença de oocistos em diferentes órgãos. Estavam presentes nas brânquias, no estômago, na glândula digestiva e no intestino. A presença dos oocistos nas fezes demonstrou a possibilidade de disseminação destes para o meio ambiente. Também foram encontrados oocistos no muco branquial sugerindo a ocorrência de repetidas filtrações e a permanência de sua capacidade infectiva.

A questão em torno da origem destes protozoários é muito ampla e complexa, permeando aspectos ecológicos e ambientais como o não tratamento de esgoto doméstico e seu lançamento diretamente no mar, ainda fatores como a criação intensiva de animais de produção, principalmente bovinos, cujos dejetos são drenados através das chuvas para rios e estes desaguardo no mar.

A presença destas três espécies provavelmente ocorra ao mesmo tempo e diversos fatores podem estar influenciando no aumento da concentração de uma delas em determinado período do ano. Por exemplo, o aumento da emissão de esgoto urbano em épocas de maior densidade populacional na região devido ao turismo no litoral, a drenagem de fezes de animais através de chuvas intensas e também de águas residuais agrícolas para rios que deságuem no mar.

Pesquisas demonstraram que atividades agroindustriais além do elevado índice populacional de uma região podem influenciar na contaminação de áreas marinhas. Na costa de Izmir (Turquia), densamente povoada e de grande atividade agrícola e industrial; verificou-se que a qualidade da água da baía melhorou após a criação da estação de tratamento de águas residuais em 2000. No entanto, as contagens de coliformes fecais se mantiveram acima do limite permitido, conseqüentemente, os mexilhões continuaram apresentando risco a saúde pública (KACAR E GUNGOR, 2010).

Na Irlanda através de técnicas biomoleculares utilizadas para avaliar a presença e a concentração de enteropatógenos humanos na água; LUCY e colaboradores (2008) encontraram espécies como *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, entre outros, envolvidos em epidemias gastrointestinais; em locais que recebem escoamento agrícola e lançamento de efluentes contendo resíduo fecal humano e animal. A contaminação de águas irlandesas por estes enteropatógenos humanos demonstra o risco para saúde pública, tanto ao consumo de água potável como para recreação e actividades aquáticas.

Lévesque et al. (2010) provaram o risco do consumo do molusco cru através da presença de diversos microrganismos indicadores de contaminação fecal em mexilhões da espécie *Mytilus edulis* de comunidades em Nunavik (Quebec). Foram encontrados *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., além dos protozoários potencialmente zoonóticos *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp., reafirmando a necessidade da recomendação do consumo de moluscos bem cozidos.

No presente estudo, apesar de a análise estatística demonstrar que não houve influência das chuvas em relação à positividade das amostras para *Cryptosporidium*, algumas pesquisas têm relacionado a presença de contaminantes fecais com algumas condições ambientais.

Miller et al (2005) demonstraram que as amostras de moluscos durante a estação chuvosa foram mais propensas a conter oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*.

Nesta pesquisa talvez o número de coletas e/ou amostras não tenha sido robusto o bastante para permitir tal associação.

Ao comparar o número de microrganismos encontrados em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, indicadores de contaminação ambiental por esgoto, como *Coliformes fecais*, entre as quatro estações do ano, Kacar (2011) afirmou que os resultados foram maiores na Primavera e no Outono. Segundo o autor, a contaminação bacteriana nestas estações pode estar relacionada a algumas condições ambientais (tais como períodos de chuvas) o que provavelmente afetou a qualidade dos mexilhões coletados naqueles meses.

Diante dos resultados do local A, provavelmente existam criações de bovinos próximos à região e uma fonte de drenagem das fezes sendo despejadas no mar justificando a contaminação dos mexilhões por *C. andersoni*, que tem como hospedeiro principal o bovino. Neste caso o índice pluviométrico, ou seja, a questão das chuvas como possível forma de carrear as fezes para o mar não se confirmou através dos dados fornecidos pelo INMET durante os meses estudados. Nos meses em que esta espécie foi prevalente, o índice de pluviosidade foi igual a zero.

A presença das espécies zoonóticas *C. meleagridis* e *C. parvum* no local A pode ser explicada pelo alto índice populacional da região com um crescimento desenfreado da urbanização com falta de saneamento básico, cujo esgoto doméstico provavelmente é despejado diretamente na água do mar sem tratamento prévio. Estes dados oficiais foram solicitados ao órgão responsável, Companhia Estadual de Água e Esgoto (CEDAE), porém não obteve-se resposta até o momento. Como *Cryptosporidium* é um protozoário de veiculação hídrica, com a forma infectante sendo eliminada através das fezes de seus hospedeiros, esses dados nos indica a insalubridade na qualidade desse ambiente aquático.

É provável que o rio do Saco, desaguando muito próximo ao local B, contenha esgoto doméstico sem tratamento de toda a região, inclusive do bairro bastante populoso da praia do Saco, e os dejetos de animais domésticos criados ao longo da Serra do Piloto, de onde nasce o rio, justificando a presença das três espécies deste local. As espécies *C. meleagridis* e *C. parvum* podem estar presentes devido a contaminação da água do mar por fezes humanas, e/ou de aves contendo oocistos no caso da primeira espécie, e/ou de bovinos ou outros mamíferos dos quais já foram isolados *C. Parvum*.

Segundo FAYER et al. (1998) oocistos de *Cryptosporidium hominis* são principalmente eliminados por seres humanos enquanto oocistos de *C. parvum* são eliminados por ambos hospedeiros humano e animal. *Cryptosporidium hominis*, *Criptosporidium bailey* e

C. parvum foram encontrados em ostras e após a detecção dos genótipos de *C. hominis* e *C. bailey* em bivalves, foi possível a investigação de fontes de poluição fecal de humanos e de aves e o surgimento de estratégias para reduzir a poluição fecal. Para o genótipo hospedeiro não específico, *C. parvum*, apenas a localização geográfica de bivalves contaminados pode fornecer indícios a respeito de fontes de poluição fecal. No presente trabalho as amostras identificadas como *C. parvum* foram submetidas a análise dos subgenótipos para avaliar a capacidade zoonótica para então se discutir possíveis estratégias, juntamente com os órgãos públicos, para a redução da poluição fecal da água do mar da região de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro.

A espécie *C. andersoni*, apesar de estar associada na grande maioria das pesquisas ao seu isolamento de fezes de bovinos não sendo caracteristicamente uma espécie de potencial zoonótico, há relatos isolados indicando sua ocorrência em humanos. No histórico das espécies endêmicas de *Cryptosporidium* que infectam humanos em várias partes do mundo, Xiao e Feng (2008) citam que as cinco espécies responsáveis pela maioria das infecções, tanto em indivíduos imunocompetentes quanto em imunocomprometidos, são: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis*. Ocasionalmente, outras poucas espécies e genótipos de *Cryptosporidium* são encontrados em humanos, como *C. muris*, *C. suis*, *C. andersoni*, e *Cryptosporidium* genótipos do cervo e do macaco.

No presente trabalho *C. andersoni* foi a espécie prevalente, das 20 amostras sequenciadas, 10 apresentaram 99% de similaridade com aquelas depositadas do genbank. Durante o ano de coleta, no mês de Maio, e de Julho a Novembro, ou seja, em 6 dos 12 meses, a espécie esteve presente em amostras de mexilhões *Perna perna* de ambos os locais A e B.

As regiões analisadas são compostas por áreas tanto urbanas como rurais, indicando o contato do homem com animais. É importante a observação da característica do turismo intensificar a ocupação da região principalmente no verão devido a presença das praias. Durante esta época do ano pode haver maior possibilidade de transmissão da doença, tanto pela ingestão dos moluscos ou água do mar contaminados, como através do contato com uma pessoa que esteja eliminando oocistos e a ingestão destes. Na Austrália estudos revelaram que, dos isolados humanos, *C. hominis* (75,2%) foi predominante tanto na área urbana como na rural; *C. parvum* (22,9%) foi mais presente nos casos urbanos e *C. meleagridis* representou 1,9% dos casos. Ainda concluíram que a principal rota de transmissão parece ser a direta de pessoa a pessoa (NG et al., 2008).

O método de detecção dos oocistos de *Cryptosporidium* utilizado nesta pesquisa através da análise de DNA, a PCR, permitiu não somente o diagnóstico do protozoário em mexilhões utilizados para alimentação humana como a identificação das espécies presentes nas amostras positivas, através do sequenciamento. O uso da Nested-PCR tornou-se especialmente importante já que é necessária uma alta sensibilidade para detectar os oocistos contidos nas amostras que provavelmente estavam em pequena quantidade e que continham um elevado grau de inibidores. Portanto, a técnica escolhida foi adequada para responder a hipótese da pesquisa apesar de suas desvantagens e limitações e existirem outras técnicas que permitam o diagnóstico em questão.

Segundo Miller et al (2005) as vantagens dos métodos IMS e DFA são que os resultados são quantitativos, e que amostras frescas ou preservadas em formalina podem ser analisadas. No entanto, tecidos congelados não são adequados para a análise por DFA, porque oocistos e cistos podem romper durante o congelamento e descongelamento. Outra desvantagem da DFA é que não pode distinguir os genótipos de *Cryptosporidium*. Contrariamente, os métodos de PCR podem ser usados para a identificação de genótipos e podem ser usados em tecidos frescos ou congelados, mas os preservados em formalina são problemáticos. A limitação de PCR convencionais é que os resultados não são quantitativos, embora o aumento da precisão da técnica através de PCR quantitativo como Taq Man PCR possa resolver este problema.

Sturbaum et al. (2002) observaram que os falsos positivos podem ocorrer através da detecção por PCR se a análise da sequência de DNA não for executada. A escolha final entre DFA e métodos de detecção da PCR pode, então, depender se o objetivo é quantificação do parasita ou identificação de genótipos, ou ambos.

Inibidores, principalmente compostos orgânicos, presentes em amostras complexas, tais como fezes e solos, podem diminuir a sensibilidade da PCR em até 1000 vezes (WARD e WANG, 2001). A falha na ruptura dos oocistos durante a extração pode impedir a liberação do DNA para a análise, a adsorção do DNA por compostos presentes nas amostras e a presença de inibidores da PCR são problemas a serem superados pelos métodos de extração (SCORZA et al., 2003).

Apesar da capacidade dos moluscos bivalves de bioacumularem poluentes e patógenos do meio aquático, ao serem transferidos para áreas limpas, são capazes de depurar as substâncias concentradas em seus tecidos. Nappier *et al.* (2010) analisaram duas espécies de ostras de Baltimore – USA quanto a capacidade de bioacumulação, retenção e depuração de

enteropatógenos humanos, dentre eles, *Cryptosporidium parvum*. A ostra *Crassostrea ariakensis* quando comparada com a ostra *C. Virgini* demonstrou ter maior capacidade bioacumuladora de enteropatógenos e menor capacidade de depuração. Os autores destacaram o papel das espécies na transmissão de várias doenças e a ameaça à saúde pública para as pessoas que consomem as ostras cruas de locais contaminados.

Nesta pesquisa os locais de coleta foram escolhidos por serem retirados os mexilhões para consumo humano e comercialização através da extração direta do costão rochoso, desta forma não há a possibilidade de transferência para regiões não contaminadas objetivando a depuração natural. Em cultivos de moluscos, este é um procedimento adequado e esperado no caso de existir um monitoramento constante através de análises periódicas tanto da água como dos animais. Entretanto, o processo de depuração aplicado aos moluscos pode ser ineficaz em relação ao *Cryptosporidium* sp. Oocistos foram detectados em amostras com tempos de depuração superior a 72 horas (SANTOS et al, 2000)

Outra maneira de assegurar a sanidade dos mexilhões como alimento seria submetê-los a processos de beneficiamento que os exponham a altas temperaturas, incluindo o simples e quase sem custo cozimento.

Uma das formas de tratamento alternativo de alimentos é o Processamento de Alta Pressão Hidrostática do inglês High hydrostatic Pressure Processing (HPP). Collins e colaboradores (2005) avaliaram a viabilidade de oocistos de *C. parvum* em ostras *Crassostrea virginica*. As ostras foram artificialmente expostas aos oocistos de *C. parvum* e submetidas ao tratamento HPP. Este método foi significativamente eficaz na redução do número de filhotes de rato positivos alimentados com tecidos de ostra expostos a oocistos de *C. parvum*. Este tipo de processamento de alimentos demonstrou a possibilidade de aplicações comerciais para melhorar a segurança de frutos do mar e reduzir os riscos de criptosporidiose à saúde pública.

6 CONCLUSÕES

- O diagnóstico de espécies de *Cryptosporidium* em amostras de mexilhões *Perna perna* obtidos dos dois locais de estudo, ambos no município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro, indica a provável contaminação ambiental por este protozoário.
- Através do sequenciamento e da análise filogenética foi possível a observação de todas as amostras sequenciadas agrupando-se à espécies correlatas já descritas, além de possibilitar o depósito das 15 sequências obtidas neste estudo no GenBank
- As três espécies encontradas, *Cryptosporidium parvum*; *C. meleagridis* e *C. andersoni*, podem causar infecção humana através da ingestão de mexilhões *Perna perna* crus ou parcialmente cozidos o que indica possíveis riscos ao consumo destes moluscos oriundos da região estudada.
- Neste estudo não houve correlação entre os índices de precipitação pluviométrica da região dos locais de coletas e a positividade das amostras de mexilhões *Perna perna*, ou seja, a chuva ou a falta desta não influenciou na presença do protozoário nos moluscos analisados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante que haja a aplicação dos resultados obtidos nesta pesquisa através da informação da população de Mangaratiba, especialmente aqueles que extraem os mexilhões dos costões, para próprio consumo e comercialização, além dos órgãos públicos competentes, a exemplo da Prefeitura Municipal, para que sejam analisadas e praticadas estratégias na tentativa de ao menos reduzir a contaminação da água do mar.

A continuação dos estudos na região no intuito de elucidar a epidemiologia será de extrema relevância já que este estudo não abordou o levantamento de dados epidemiológicos como a investigação de casos humanos e animais de criptosporidiose.

8 REFERÊNCIAS

- ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Comparative study of PCR-based *Cryptosporidium* discriminating techniques with a review of literature. **Kansenshogaku Zasshi**. v. 76, n. 10, p. 869-881. 2002.
- ADAMSKA, M; LEOŃSKA-DUNIEC, A.; MACIEJEWSKA, A; SAWCZUK, M; SKOTARCZAK, B PCR and Real Time PCR for the Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocyst DNA. **Folia biologica** (Kraków), v. 59, n. 3-4 (2011), p.115-120, 2011.
- ADJEL, A; ARMAH, H; RODRIGUES, O; RENNER, L; BORKETEY, P; AYEK-KUMI, P; ADIKU, T; SIFAH, E; LARTEY, M *Cryptosporidium* spp., a frequent cause of diarrhea among children at the Korle-bu Teaching Hospital, Accra, Ghana. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 57, p. 216-219, 2004.
- ADL, S. M. *et al.* The new higher level classification of eucaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399-451, 2005.
- AGNEWS D. G *et al.* Cryptosporidiosis in northeastern Brazilian children: association with increases diarrhea morbidity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 3, p. 754-760, 1998.
- AJJAMPUR, S.S. *et al.* Molecular and spatial epidemiology of cryptosporidiosis in children in a semiurban community in South India. **J. Clin. Microbiol.** v.45, p.915–920, 2007.
- AKIYOSHI, D. E. *et al.* Genetic Analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype I isolate passaged through different host species. **Infection and Immunity**. v.70, n. 10, p. 5670-5675, 2002.
- ALMEIDA, T. T. C. Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase). 130 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública), Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2004.
- ALVES, M., XIAO, L., SULAIMAN, I., LAL, A.A., MATOS, O., ANTUNES, F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle and zoo ruminants in Portugal. **J. Clin. Microbiol.** v.41, p 2744–2747. 2003.
- AMAR, C. F. L.; DEAR, P. H.; McLAUCHLIN, J. Detection and identification Br real-time PCR/RFLP analyses of *Cryptosporidium* species from human faeces. **Letters in Applied Microbiology**. v.38, n.1, p. 217-222, 2004.
- AMARANTE, H. M. B. **Ocorrência do *Cryptosporidium* sp. em indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes em Curitiba**. 122 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1992.

AMIN O. M Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.66, n.6, p. 799-803, 2002.

ANDREU, B. El cultivo Del mejillón en Europa. (I) Aspectos biológicos y Ecológicos: Enemigos y parasitos. **Anais, Acad. Bras. Cienc.** v.47, p.23-46, 1976.

ARAÚJO, A. J. U. dos S. *et al.* Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from hiv-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 3, 2008.

ARCOVERDE C. A. C. **Enteroparasitoses em pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001

AVELAR, J. C. L. **Manual de Mitilicultura**, Ministério do Meio Ambiente/Plano Nacional de Meio Ambiente/Plano de Execução Descentralizada. 1ª Edição. Brasília, 1998, p.164.

BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 4ª ed. São Paulo, Editora Livraria Roca Ltda., 1990, p. 419-463.

BARTA JR, THOMPSON R.C.A. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends Parasitol**, v. 22, p. 463-468, 2006.

BERTULLO, V. Tecnologia de los productos y Subproductos de Pescados, Moluscos y Crustáceos. **Ed. Hemisferio Sur**. 1ª edición. Buenos Aires-Argentina, 1975. p.538.

BLUNT, D.S., KHRAMSTOV, N.V., UPSTON, S.J., AND MONTELONE, B.A. Molecular karyotype analysis of *Cryptosporidium parvum*: Evidence for eight chromosomes and a low-molecular-size molecule. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v.4, p. 11–13, 1997.

BOEHMER, T. K. *et al.* Cryptosporidiosis from a community swimming pool: outbreak investigation and follow-up study. **Epidemiology and Infection**, v. 137, p. 1651- 1654, 2009.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; NOORDAA, J. Rapid and simple Method for purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BROOK, E.J., ANTHONY HART, C., FRENCH, N.P., CHRISTLEY, R.M., Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. **Vet. J.** v.179, p.378–382, 2009.

CACCIÒ, S.; CAMILLI, R.; LA ROSA, G.; POZIO, E. Establishing the *Cryptosporidium parvum* karyotype by NotI and SfiI restriction analysis and Southern hybridization. **Gene**, v. 28, n. 1, p. 73-79, 1998.

CACCIÒ, S.M. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. **Parasitology**, v. 47, p. 185–92, 2005.

CAMA V. A, BERN C, ROBERTS J, CABRERA L, STERLING C.R, ORTEGA Y, GILMAN R.H, XIAO L. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. **Emerg Infect Dis.** v. 14, p. 1567-1574, 2008.

CAMA V. A, ROSS J. M, CRAWFORD S, KAWAI V, CHAVEZ-VALDEZ R, VARGAS D, VIVAR A, TICONA E, NAVINCOPA M, WILLIAMSON J, ORTEGA Y, GILMAN R. H, BERN C, XIAO L. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. **J Infect Dis.** V. 196: p. 684-691, 2007.

CAMA V. A., BERN C., SULAIMAN I.M., GILMAN R.H., TICONA E., VIVAR A., KAWAI V., VARGAS D., ZHOU L., XIAO L.. *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. **J. Eukaryotic Microbiol.**, v.50(Suppl.), p. 531-533, 2003.

CANTUSIO NETO, R., SANTOS, L. U; FRANCO, R. M. B. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, southeast Brazil. **Wat. Sci. Technol.** 54(3), 89–94, 2006.

CARPENTER, C., FAYER, R., TROUT, J., BEACH, M. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. **Emerg. Infect. Dis.** v.5, p. 579–584. 1999.

CARRENO, R.A.; MARTIN, D.S.; BARTA, J.R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Research**, v. 85, n. 11, p. 899-904, 1999.

CARVALHO FILHO, J. Panorama da malacocultura brasileira. **Panorama da Aqüicultura.** São Paulo, v.64, p. 25-31, 2001.

CARVALHO-ALMEIDA, T.T; CASIMIRO, A.M; MATTE, G.R; MATTE, M.H. Na improved method for extracting *Cryptosporidium* sp DNA from preserved faeces and potential application for cryptosporidiosis surveillance. **Rev Bras Vig Sanit.** v. 1, p. 208-231, 2006.

CENTRO DE REFERÊNCIA E TREINAMENTO EM DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS/AIDS (CRT-DST/AIDS), São Paulo, 1997. Disponível em <http://www.saude.sp.gov.br/centro-de-referencia-e-treinamento-dstaidsp/>. Acesso em agosto de 2009.

CHACÍN-BONILLA L, BARRIOS F, SANCHEZ Y Environmental risk factors for *Cryptosporidium* infection in an island from Western Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p.45-49, 2008.

CHALMERS, R. M; ROBINSON G; ELWIN K, HADFIELD S. J, THOMAS E; WALTJKINS J; CASEMORE D, K. D. Detection of *Cryptosporidium* species and sources of contamination with *Cryptosporidium hominis* during a waterborne outbreak in North West Wales. **J Water Health.** v 8, p.311–25, 2010.

CHALMERS, R.M; HADFIELD, S.J; JACKSON C.J; ELWIN K, XIAO L, HUNTER P. Geographic linkage and variation in *Cryptosporidium hominis*. **Emerg Infect Dis**. V.14, p. 496-498, 2008.

CHEN, X M; KEITHLY JS, PAYA CV, LARUSSO NF. Cryptosporidiosis. **N Engl J Med**. 30; v.346, n. 22, p. 1723-31, 2002.

COLLINS, M. V.; FLICK, G. J; SMITH, S. A; FAYER, R.; RUBENDALL, E.; LINDSAY, D. The Effects of E-beam Irradiation and Microwave Energy on Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*) Experimentally Infected with *Cryptosporidium parvum*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.52, n.6, p. 484–488, 2005.

CORNELISEN, C. D; GILLESPIE, P. A; KIRS, M; YOUNG, R. G; FORREST, R. W; BARTER, P. J; KNIGHT, B. R; HAWOOD, V. J. Motueka River plume facilitates transport of ruminant faecal contaminants into shellfish growing waters, Tasman Bay, New Zealand New Zealand. **Journal of Marine and Freshwater Research**. v. 45, n. 3, p. 477-495, 2011.

CRAWFORD, F. G; VERMUND, S.H. Human Cryptosporidiosis. **Critical Review of Microbiology**. n. 16, p 113-159, 1988

CURRENT, W. L.; GARCIA, L. S. Cryptosporidiosis. **Clinical Microbiological Reviews**, Jul, p. 325-358, 1991.

DOWNEY, A. S. *et al.* Efficacy of Pyrvinium Pamoate against *Cryptosporidium parvum* Infection In Vitro and in a Neonatal Mouse Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3106-3112, 2008.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE SANTA CATARINA (EPAGRI) **Síntese informativa da produção de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras) no estado de Santa Catarina em 2009**. Disponível em <http://www.epagri.rct-sc.br>. Acesso em outubro de 2010.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE SANTA CATARINA. (EPAGRI), 2010. Disponível em <http://www.epagri.sc.gov.br/>. Acesso em janeiro de 2011.

FAYER R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Vet Parasitol**, n. 126, p. 37–56, 2007.

FAYER, R. *et al.* Detection of *Cryptosporidium felis* and *Giardia duodenalis* Assemblage F in a cat colony. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 44-53, 2006.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 90-97, 2010.

FAYER, R., GRACZYK, T.K., LEWIS, E.J., TROUT, J.M., FARLEY, C.A., Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. **Appl. Environ. Microbiol.** v.64, p. 1070–1074. 1998.

FAYER, R., LEWIS, E.J., TROUT, J.M., GRACZYK, T.K., JENKINS, M.C., HIGGINS, J., XIAO, L., LAL, A.A., *Cryptosporidium* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. **Emerg. Infect. Dis.** V. 5, p. 706–710. 1999.

FAYER, R., TROUT, J.M., LEWIS, E.J., SANTIN, M., ZHOU, L., LAL, A.A., XIAO, L. Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. **Parasitol. Res.** 89, 141–145, 2003.

FAYER, R., TROUT, J.M., LEWIS, E.J., XIAO, L., LAL, A.A., JENKINS, M.C., GRACZYK, T.K. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. **Parasitol. Res.** V. 88, p. 998–1003, 2002

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

FAYER, R.; SANTÍN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**. v. 164, n. 14, p.192-200, 2009.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**. v. 1, n. 3, p. 191-198, 2008.

FAYER, R.; SPEER, C. A.; DUBER, J. P. The general Biology of *Cryptosporidium*. IN: FAYER, R. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. **CRC Press:Washington**, p. 1-60, 1997.

FAYER, R; SANTIN, M; TROUT, J.M. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p 260–266, 2007.

FELTUS, D.C., GIDDINGS, C.W., KHAITSA, M. L., MCEVOY, J. M. High prevalence of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in calves compared to mature cows in beef cow-calf operations. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p. 191–195, 2008.

FENG, Y., ALDERISIO, K.A., YANG, W., BLANCERO, L.A., KUHNE, W.G., NADARESKI, C.A., REID, M., XIAO, L., *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. **Appl. Environ. Microbiol.** v.73, p. 6475–6483, 2007.

FERGUSON, C.; DEERE, D.; SINCLAIR, M.; CHALMERS, R. M.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.; XIAO, L.; RYAN, U.; GASSER, R.; EL-OSTA, Y. A.; STEVENS, M. Meeting report: Application of genotyping methods to assess risks from *Cryptosporidium* in watersheds. **Environmental Health Perspectives**. v. 114, n. 3, p. 430-434, 2006.

FERNANDES, F. C. **Manual de maricultura**. Ministério da Marinha, Instituto Nacional de estudos do Mar. 1985, p. 24.

FERNANDES, F. C.; TENENBAUM, D.R.; SAIDAH, F. E. M. Conteúdo estomacal e considerações gerais sobre a alimentação do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) Mollusca – Bivalvia. **V Simp. Latino Americano sobre oceanografia biológica**. Resumo, p.326, 1978.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura** Roma,. 2010. 219p. disponível em <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s.pdf> . Acesso em julho de 2011.

FRANCO, R.M.B; 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.

FREIRE-SANTOS, F; GOMEZ-COUSO, H; ORTEGA-INARREA, M. R; CASTRO-HERMIDA, J. A; OTEIZA-LOPEZ, A. M; GARCIA-MARTIN, O; ARES-MAZAS, E. Survival of *Cryptosporidium* parvum oocysts recovered from experimentally contaminated oysters (*Ostrea edulis*) and clams (*Tapes decussatus*). **Parasitol Res**, v. 88, p. 130–133, 2002.

FREIRE-SANTOS, F; OTEIZA-LOPEZ, A. M; VERGARA-CASTIBLANCO, C.A; ARES-MAZAS, E; ALVAREZ-SUAREZ, E; GARCIA-MARTIN, O. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. **J. Parasitol**, v, 86, p. 853–4, 2000.

GAMBA, R. C.; CIAPINA, E.M; ESPINDOLA, R.S; PACHECO, A.; PELLIZARI, V. H. Detection of *Cryptosporidium* sp. Oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, São Paulo-Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** v.31, p. 151–153, 2000.

GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, p. 1267–1268, 2000.

GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **Journal Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1526–1529, 1997.

GASSER, R. B. Molecular tools – advances, opportunities and prospects. **Veterinary parasitology**. v. 136, n. 1, p.69-89, 2006.

GASSER, R. B.; ABS EL-OSTA, Y. G. ; CHALMERS, R. M. Eletrophoretic Analysis of genetic variability within *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis in the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**. V.69, n. 5, p. 2719-2730, 2003.

GERBA, C.P., ROSE, J.B; HAAS, C.N. Sensitive population: who is at the greatest risk? **International Journal of Food Microbiology**, n. 30, p. 113–123, 1996.

GLABERMAN, S., SULAIMAN, I.M., BERN, C., LIMOR, J., PENG, M.M., MORGAN, U., GILMAN, R., LAL, A.A., XIAO, L. A multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* meleagridis. **J. Eukaryot. Microbiol.** p.19–22, 2001.

GOMES, A.H.S.; PACHECO, M.A.S.R.; FONSCECA, Y.S.K.; et al. Pesquisa de *Cryptosporidium* sp em aguas de fontes naturais e comparacao com analises bacteriologicas, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61 (1), p. 59-63, 2002.

GOMEZ-BAUTISTA, M., ORTEGA-MORA, L.M., TABARES, E., LOPES-RODAS, V., COSTAS, E. Detection of infectious *Cryptosporidium* parvum oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). **Appl. Environ. Microbiol.** V. 66, p. 1866–1870. 2000.

GOMEZ-COUSO, H; FREIRE-SANTOS, F; AMAR, C. F. L; GRANT, K. A; WILLIAMSON, K., ARES-MAZAS, M. E; MCLAUCHLIN, J. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. **Int. J. Food. Microbiol**, n. 91, p. 279–288, 2004.

GOMEZ-COUSO, H; FREIRE-SANTOS, F; HERNANDEZ-CORDOVA, G. A; ARES-MAZAS, M. E. A histological study of the transit of *Cryptosporidium* parvum oocysts through clams (*Tapes decussatus*). **Int. J. Food. Microbiol**, n. 102, p. 57–62, 2005.

GOMEZ-COUSO, H; FREIRE-SANTOS, F; MARTINEZ-URTAZA, J; GARCIA-MARTIN, O; ARES-MAZAS, M. E. Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. **Int. J. Food. Microbiol**, n. 87, p. 97–105, 2003.

GOMEZ-COUSO, H; MÉNDEZ-HERMIDA, F; CASTRO-HERMIDA, J. A; ARES-MAZAS E. *CRYPTOSPORIDIUM* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. **J. Food Prot**, n. 69, p. 185–90, 2006.

GONÇALVES, E. M. do N. *et al.* Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. **Clinics**, v. 61, n. 2, p. 119-126, 2006.

GOOGLE EARTH®. Localização do Município de Mangaratiba, Estado do Rio de Janeiro. Acesso em novembro de 2011.

GOUJON, M.; MCWILLIAM, H.; LI, W.; VALENTIN, F.; SQUIZZATO, S.; PAERN, J.; LOPEZ, R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. **Nucleic acids research**, v. 38, suplemento W, p. w695-699, 2010.

GRACZYK, T. K., DA SILVA, A.J., CRANFIELD, M.R., NIZEYI, J.B., KALEMA, G.R., PIENIAZEK, N.J. *Cryptosporidium* parvum genotype 2 infections in free-ranging mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) of the Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. **Parasitol. Res.** v.87, p. 368–370, 2001.

GRACZYK, T. K., FAYER, R., CRANFIELD, M. R; CONN, D. B. Invitro interactions of Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*) hemocytes and *Cryptosporidium* parvum oocysts. **Appl. Environ. Microbiol**, n. 63, p. 2910–2912, 1997.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; FAYER, R.; ANDERSON, M.S. Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage though a refractory avian host. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.62, p.3234-3237, 1996.

GRIFFITHS J. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis. **Advances in Parasitology**, v. 40, p. 37-50, 1998.

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. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2004.

HENRIQUES, P.; O.M., ZAMARIOLI, L.A.; FAUSTINO, J.S. Contaminação bacteriológica no tecido mole do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) coletado nos bancos naturais do litoral da Baixada Santista. **Arquivos de Ciências do Mar**, Ceará: UFCE, LABOMAR, v. 33, p.69-76, 2000.

HIJJAWI, N.S., MELONI, B.P., RYAN, U.M., OLSON, M.E., THOMPSON, R.C., Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. **Int. J. Parasitol.** v.32, p. 1719–1726, 2004.

HUBER, F.; SILVA da, S.; BOMFIM, T.C.B.; TEIXEIRA, K.R.S., BELLO, A.R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.150, p.65-74, 2007.

HUNTER, P.R.; HADFIELD, S.J.; WILKINSON, D.; LAKE, I.R.; HARRISON, F.C.; CHALMERS, R.M. Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. **Emerging Infection Diseases**, v. 13, n.1, p. 82-88, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET) – Informação de dados de precipitação pluviométrica da estação de Marambaia, Rio de Janeiro durante os meses de Março /2009 a Fevereiro/2010.

IACOVSKI, R.B, BARARDI, C.R.M, SIMÕES C.M.O Detection and enumeration of *Cryptosporidium* sp. oocysts in sewage sludge samples from the city of Florianópolis (Brazil) by using immunomagnetic separation combined with indirect immunofluorescence assay. **Waste Management & Research**. v.22, p. 171-176. 2004.

JEX, A.R.; GASSER, R.B. Analysis of the genetic diversity within *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis by mutation scanning. **Electrophoresis**, v. 29, n. 20, p 4119-4129, 2008.

JOHNSTON, S.P.; BALLARD, M.M.; BEACH, M.J.; CAUSER, L.; WILKINS, P.P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, p .623–6, 2003.

KACAR, A; GUNGOR, F. Comparison of fecal coliform bacteria before and after wastewater treatment plant in the Izmir Bay (Eastern Aegean Sea). **Environ Monit Assess**, v. 162, p. 355–363, 2010.

KACAR; A. Some microbial characteristics of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in coastal city area. **Environ Sci Pollut Res**, v. 18, p. 1384–1389, 2011.

KARANIS, P., PLUTZER, J., HALIM, N.A., IGORI, K., NAGASAWA, H., ONGERTH, J., LIQING, M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. **Parasitol. Res.** v.101, p. 1575–1580, 2007.

KING, B. J.; HOEFEL, D; DAMINATO, D.P; FANOK, S; MONIS, P. T. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. **J Appl Microbiol** v.104, p. 1311-1323, 2008.

KORICH DG, MEAD JR, MADORE MS, SINCLAIR NA, STERLING CR. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, p. 1423–8, 1990.

TAMURA, K KUMAR, S;., NEI, N. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* v.5, p.150-163, 2004. Disponível: http://www.megasoftware.net/m_con_select.html. Acesso em: Janeiro de 2012.

LAGE, H. **Coleta e comercialização do mexilhão *Perna perna* na Baía de Guanabara. Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2006. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Oceanografia) Instituto de Geociências, Departamento de Oceanografia e Hidrologia. Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006.

LALLO, M. A. Criptosporidiose canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 20 - 22, 1996.

LANGKJAR, R. B; VIGRE, H; ENEMARK, H. L; MADDUX-HYTTEL, C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. **Parasitology**, v. 134, p. 339–350, 2006.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, v.23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LAUBACH, H. E; BENTLEY, C. Z; GINTER, E. L; SPALTER, J. S; JENSEN, L.A. A study of risk factors associated with the prevalence of *Cryptosporidium* in villages around lake Atitlan, Guatemala. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, n. 8, v. 4, p. 319-323, 2004.

LEAL, D. A. G; DORES, R. A. P; MARQUES, S. S; DURIGAN, M; GREINERT, G. J. A; MORESCO, V; AMSTUTZ, R. C; MICOLI, A. H, NETO R. C, MONTE BARARDI, R; FRANCO, R. M. B. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in southeastern brazil using an U.V based depuration system. **Ocean and Coastal Management**, 2011.

LEAL, D. A. G; PEREIRA, M. A; FRANCO, R. M. B; BRANCO, N; CANTUSIO NETO, R. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*). **Brazil Journal of Water and Health**, v. 6, n. 4, 2008.

LÉVESQUE, B.; BARTHE, C.; DIXON, B. R.; PARRINGTON, L. J.; MARTIN, D., DOIDGE, B.; MURPHY, D. Microbiological quality of blue mussels (*Mytilus edulis*) in Nunavik, Quebec: a pilot study. **Can. J. Microbiol.** v. 56, p. 968–977, 2010.

LI, X; GUYOT, K; DEI-CAS, E; MALLARD, J. P; BALLEST, J. J; BRASSEUR, P. *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). **Int. J. Food Microbiol.**, v. 108, p. 321–325, 2006.

LOUIE K, GUSTAFSON L, FYFE M, GILL I, MACDOUGALL L, TOM L, WONG Q, ISAAC-RENTON J An outbreak of *Cryptosporidium parvum* in a Surrey pool with detection in pool water sampling. **Canada Communicable Disease Report** , v30, n7, p. 61-66, 2004.

LUCY, F. E; CONNOLLY, M; GRACZYK, T, K; TAMANG, L; SULLIVAN, M. R; MASTITSKY, S. E. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) are effective sentinels of water quality irrespective of their size. **Aquatic Invasions**, v. 5, n. 1, p. 49-57, 2008.

LUNA, S; LILIANA, R. L; CHINGILLA, M.; CATARINELLA, G. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium spp* en aguas superficiales en Costa Rica. **Parasitologia Latinoamericana** v.57, p. 63-65, 2002.

MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KAZMIERCZAK, J.J.; ADDISS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, p. 161–7, 1994.

MACRAE, M; HAMILTON, C; STRACHAN, N.J.C; WRIGHT, S; OGDEN, I.D. The detection of *Cryptosporidium parvum* and *Escherichia coli* O157 in UK bivalve shellfish. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, p. 395–401, 2005.

MARENZI, A. W. C.; BRANCO, J. O. O mexilhão *Perna perna* (Linnaeus) (Bivalvia, Mytilidae) em cultivo na Armação do Itapocoroy, Santa Catarina, Brasil. **Rev. Bras. de Zool.** v. 22, n.2, p. 394-399, Junho 2005.

MARINHA DO BRASIL. **Carta Náutica 2011**. Disponível em http://www.mar.mil.br/dhn/chm/cartas/download/cartasbsb/cartas_digitais_internet.htm. Acesso em junho de 2011.

MARTINEZ, A, L. N; ÁGUILAB, C; BORNAY-LLINARES, F. J. *Cryptosporidium*: un género en revisión. Situación en España. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 29, n. 2, p. 135–143, 2011.

MASCARINI L M; DONALÍSIO, M. R. Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 577-579, 2006.

MCGUIGAN, C.. *Cryptosporidium* outbreak after a visit to a wildlife centre in northeast Scotland: 62 confirmed cases. **Eurosurveillance**, v.10, n. 4, 2005.

McLAUHLIN, J.; PEDRAZA-DIAZ, S.; AMAR-HOETZENEDER, C.; NICHOLS, G. L. Genetic Characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea

diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, n.10, 1999.

MEIRELES, M.V.; SOARES, R.M. DOS SANTOS, M.M.; GENNARI, S.M. Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). **Journal for Parasitology**, v. 92, n. 3, p.623-626, 2006.

MEISEL, J.L.; PERERA, D.R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C.E. Overhelimng watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in a imunossupressed patient. **Gastroenterology**, v.70, p.1156-1160, 1976.

MENDONÇA, C; ALMEIDA, A; CASTRO, A; DELGADO, M. L; SOARES, S; COSTA, J. M. C; CANADA, N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 47-50, 2007.

MILLER, W. A; ATWILL, E. R; GARDNER, I. A; MILLER, M. A; FRITZ, H. M; HEDRICK, R. P; MELLI, A. C; BARNES, N. M; CONRAD, P. A. Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. In freshwater ecosystems in California. **Int. J. Parasitol.**v. 35, p.673–684, 2005.

MILLER, W. A; MILLER, M. A; GARDNER, I. A; ATWILL, E. R; HARRIS, M; AMES, J; JESSUP, D; MELLI, A; PARADIES, D; WORCESTER, K; OLIN, P; BARNES, N; CONRAD, P.A. New genotypes and factors associated with *Cryptosporidium* detection in mussels (*Mytilus* spp.) along the California coast. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1103–1113, 2006.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2010 disponível em: http://www.mpa.gov.br/#imprensa/2011/MAIO/nt_MAI_13-05-O-Ministerio-da-Pesca-e-Aquicultura-disponibiliza; Acesso em julho de 2011.

MISIC, Z., ABE, N. Subtype analysis of *Cryptosporidium* parvum isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. **Parasitology**. v.134, p. 351–358, 2007.

MOHANDAS K, SEHGAL R, SUD A, MALLA N Prevalence of intestinal parasitic pathogens in HIV-seropositive individuals in Northern India. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. v. 55, p.83-84, 2002.

MORGAN-RYAN, U. M., FALL, A.; WARD, L. A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C.; OLSON, M. ; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 49, n. 1, p.433–440, 2002.

NAPPIER, S.P.; GRACZYK, T.K.; TAMANG, L.; SCHWAB, K.J. Co-localized *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* Oysters differ in bioaccumulation, retention and depuration of microbial indicators and human enteropathogens. **Journal of Applied Microbiology**. v.52, p. 198-213, 2010.

NEWMAN, R.D.; JAEGER, K.L.; WUHI, T.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L.; SEARS, C.L. Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* oocysts. **Journal Clinical Microbiology**. v. 31, p. 2080–2084, 1993.

NSW FOOD AUTHORITY. **Food Regulation 2010**. Disponível em <<http://www.foodauthority.nsw.gov.au/industry/food-standards-and-requirements/legislation/foodregulation/>>. Acesso em julho de 2011.

O'BRIEN, E., MCINNES, L., RYAN, U. *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. **Exp. Parasitol.** V.118, p. 118–121, 2008.

O'CONNOR, P. National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. **Marine Environmental Research**, v. 53, p. 117–143, 2002.

O'DONOUGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**. v. 25, n. 2, p. 139-195, 1995.

OLIVEIRA-SILVA, M. B *et al.* Seasonal profile and level of CD4 Seasonal profile and level of CD4+ lymphocytes in the occurrence of cryptosporidiosis and cystoisosporidiosis in HIV/Aids patients in the Triângulo Mineiro region, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.40, n. 5, p. 512-515, 2007.

ORDÓÑEZ, J.A.; RODRÍGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G., MINGUILLÓN, G.D.G.F. PERALES, L.H.; CORTECERO, M.D.S. **Tecnología de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed,. 2005, v.2, 279 p.

OSAKI SC, COSTA AO, OLIVEIRA-SILVA MB, PEREIRA JT, PAULINO RC, CASTRO EA, THOMAZ-SOCCOL V Otimização da técnica de PCR para detecção de *Cryptosporidium* em água, pp 1-9. XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba, 2007.

OSHIRO, E.T; DORVAL, M.E.C; NUNES, V.L.B; SILVA, M.A.A; SAID, L.A.M Prevalência do *Cryptosporidium* parvum em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.33, n. 3, p.277-280, 2000.

PENG, M.M., WILSON, M.L., HOLLAND, R.E., MESHNICK, S.R., LAL, A.A., XIAO, L. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. **Parasitol.Res.** v. 90, p. 175–180, 2003.

PEREIRA, C.S.; VIANA, C.M.; RODRIGUES, D.P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de uréase isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas *in natura* em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.24, n.4, p.591-595, out.-dez. 2004.

PEREIRA, S.J., RAMIREZ, N.E., XIAO, L., WARD, L.A. Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium* parvum in gnotobiotic pigs. **J. Infect. Dis.** v.186, p. 715–718, 2002.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 12, p. 187-199, 2009.

POMMEPUY, M; DUMANS, F; CAPRAIS, M. P; CAMUS, P; LEMENNEC, C; PARNAUDEAU, S; HAUGARREAU, L; SARRETTE, B; VILAGINES, P; POTHIER, P; KHOLI, E; LEGUYADER, F. Sewage impact on shellfish microbial contamination. **Water Sci. Technol**, v. 50, p. 117–124, 2004.

POZIO E. *et al.* Clinical cryptosporidiosis and human immunodeficiency virus (HIV)-induced immunosuppression: findings from a longitudinal study of HIV-positive and HIV-negative former injection drug users. **The Journal of Infectious Diseases** v.176, p.969-975, 1997.

PUTIGNANI, L; MENICHELLA, D. Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium*. **Hindawi Publishing Corporation Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2010, Article ID 753512, p. 39, 2010.

REDLINGER T, CORELLA-BARUD V, GRAHAM J, GALINDO A, AVITIA R, CARDENAS V Hyperendemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking municipal sewer and water on the United States-Mexico border. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 66, n.6, p. 794-798, 2002.

REDUKER D.W; SPEER C. A; BLIXT J. A. Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and encysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy. **J. Protozool**, v 32, p. 708-711, 1985.

REICHENBACH-KLINKE, H.H.; AHNE, W.; NEGELE, R.D. **Enfermedades de los peces**. Zaragoza: Acribia, 1982. 507 p.

RESGALLA JR., C.R.; WEBER, L.I.; CONCEIÇÃO, M.B. **O mexilhão *Perna perna* (L.): biologia, ecologia e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 324p.

RIMHANEN-FINNE, R; RONKAINEN, P.; HAANNINEN, M.-L. Simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* in sewage sludge by IC-PCR. **J. Appl. Microbiol**, v. 91, p. 1030–1035, 2002.

ROBERTSON, L. J; GJERDE, B. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. **J. Food Prot**, v. 64, p. 1793–1798, 2008.

ROBERTSON, L. J; GJERDE, B; HANSEN, E. F. et al. A water contamination incident in Oslo, Norway during October 2007; a basis for discussion of boil-water notices and the potential for post-treatment contamination of drinking water supplies. **J. Water Health**, v. 7, p. 55-66, 2009.

ROBERTSON, L.J., CAMPBELL, A.T., SMITH, H.V. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. **Appl. Environ. Microbiol.** v.58, p. 3494–3500, 1992.

ROBERTSON, L.J; FORBERG, T; HERMANSEN, L; GJERDE, B.K; ALVSVAG, J. O; LANGELAND, N. *Cryptosporidium parvum* infections in Bergen, Norway, during an

extensive outbreak of waterborne giardiasis in autumn and winter 2004. **Applied and Environmental Microbiology**. v.72, n3, p. 2.218-2.220, 2006.

ROBINSON, G. *et al.* Unusual *Cryptosporidium* Genotypes in Human Cases of Diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, 2008.

ROBINSON, G; WRIGHT, S; ELWIN K; et al. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. **Int J Parasitol**. 2010.

ROCKZANSKI, M.; COSTA, S. W.; BOLL, M. G.; OLIVEIRA NETO, F. M., A evolução da aqüicultura no Estado de Santa Catarina, Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE Aqüicultura, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis, ABRAQ, 2000.

ROSE, J.B., LISLE, J.T., LECHEVALLIER, M. Waterborne cryptosporidiosis: incidence outbreaks, and treatment strategies. In: Fayer, R. (Ed.), **Cryptosporidium and Cryptosporidiosis**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1997. p. 93-110.

ROSSIGNOL, J. F. *Cryptosporidium* and *Giardia*: Treatment Options and Prospects for New Drugs Jean-François. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 45-43, 2010.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6ª ed. São Paulo, Editora Livraria Roca Ltda. 1996, p. 412- 451.

RYAN, U. M. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. **Experimental Parasitology**, v. 124, n.1, p.113-120, 2010.

RYAN, U. M; Xiao,L. “**Molecular epidemiology and typing of non-human isolates of *Cryptosporidium*,**” In: *Giardia and Cryptosporidium: From Molecules to Diseases*, G. ORTEGA-PIERRES, G; CACCIO, S. M; FAYER, R; MANK, T. G; SMITH, H. V; R. C. A. Thompson, Eds., chaper VI, pp. 65–80, CABI, Oxfordshire, UK, 2009.

RYAN, U.M, POWER, M; XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). **J Eukaryot Microbiol** v.55, n. 22-26, 2008.

SALAYA, J. J.; BEAUPERTHUY, I.; MARTINEZ, J. Estudios sobre a la biologia, pesqueira y cultivo del mejillon, *Perna perna* en Venezuela. **Minist. Agric. Y Cria. In Inf. Tec.** n.62, p. 50, 1973.

SANTÍN, M., TROUT, J.M., FAYER, R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. **Vet. Parasitol.** V.155, p. 15–23, 2008.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. **Vet Parasitol**, v. 146, p.17-24, 2004.

SANTOS, E. **Moluscos do Brasil: vida e costumes**. Belo Horizonte: Itatiaia Ltda, Coleção Zoologia Brasília, v.7, 1982. 141 p.

SANTOS, M. M. A. B. *et al.* *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: clinical, morphological and molecular studies. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, n. 2, 2009.

SAVIOLI L, SMITH H, THOMPSON A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends Parasitol.** v.22, p. 203-208, 2006.

SCHETS, F. M; HAROLD, H. J. M; BERG, V. D; ENGELS, G. B; LODDER, W. J; HUSMAN, A. M. R. *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, the Netherlands. **Int. J. Food. Microbiol.** v. 113, p. 189–194, 2007.

SCHNYDER, M. *et al.* Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 149-154, 2009.

SCHRIEWER, A; WEHLMANN, S; WUERTZ. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p. 16–21, 2011.

SCORZA, A. V.; BREWER, M. M.; LAPPIN, M. R. Polymerase Chain Reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. In cat feces. **Journal of Parasitology.** v. 89, n. 2, p.423-426, 2003.

SECRETARIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA - SEAP. Presidência da República - **Estatística da Aqüicultura e Pesca no Brasil 2005**. Disponível em http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/estatistica/, acesso em junho de 2008.

Série Manuais BMLP de Maricultura, Cultivo de Mexilhões; Brazilian Mariculture Linkage Program – Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura, p. 6, 2003.

SHAHIDUZZAMAN, M. *et al.* Combination of cell culture and quantitative PCR for screening of drugs against *Cryptosporidium parvum*. **Veterinary Parasitology.** v.162, n. 3-4, p. 271-277, 2010.

SILVA, C. G. M. da *et al.* Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura*, no Recife. **Ciência & Saúde Coletiva.** v. 10, p. 63-69, 2004.

SLIFKO, T. R. *et al.* Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1379-1393, 2000.

SMITH, H. V; ROSE, J. B..Waterborne cryptosporidiosis. **Parasitology Today.** v.6, p.8-12, 1998.

SMITH, H.V.; CAMPBELL, B.M.; GRIMASON, A.M. A microscopic system with a dual band filter for the simultaneous enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts and sporozoites. **Water Research**, v. 37, n. 10, p. 2525-2527, 2002.

- SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.; MALLON, M.; MACLEOD, A.; TAIT, A.; REILLY, W.J.; BROWNING, L.M.; GRAY, D.; REID, S.W.; WASTLING, J. M. Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. **Veterinary Records**. v. 156, n. 22, p.710-711. 2006.
- SMITH, J. L. *Cryptosporidium* and *Giardia* as agents of foodborne disease. **Journal of Food Protection**. v.56, n.5, p. 451-461, 1993.
- SOBA, B., LOGAR, J. Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. **Parasitology**. v.135, p. 1263–1270, 2008.
- SOBA, B., PETROVEC, M., MIOC, V., LOGAR, J. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. **Clin. Microbiol. Infect.** v.12, p. 918–921, 2006.
- STORER, T. L.; USINGER, R. L. **Zoologia Geral**. 2ªed. São Paulo, Companhia Editora Nacional. 1976. p.418- 425.
- SULAIMAN, I.M., *et al.* Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. **J. Clin. Microbiol.** v.43, p. 2805–2809, 2005.
- TAMBURRINI A, TOSINI F, LA ROSA G, POZIO E, CACCIÒ S Identification and characterization Identification and characterization of three antigenic proteins from *Cryptosporidium parvum* sporozoites using a DNA library expressing poly-histidine tagged peptides. **International Journal for Parasitology**. v. 29, n.12, p.1.925-1.933. 1999.
- TAMBURRINI, A; POZIO, E. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Int. J. Parasitol.** v. 29, p. 711–715, 1999.
- TUMWINE J K, KEKITIINWA A, BAKEERA-KITAKA S, NDEEZI G, DOWNING R, FENG X, AKIYOSHI DE, TZIPORI S Cryptosporidiosis and microsporidiosis in Ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.73, n. 5, p.921-925, 2005.
- TZIPORI S, WIDMER G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. **Trends Parasitol.** v.24, p. 184-189, 2008.
- WANG, K, X, LI CP, WANG J, PAN BR Epidemiological survey of cryptosporidiosis in Anhui Province China. **World Journal of Gastroenterology**. v.8, n. 2, p. 371-374, 2002.
- WIELINGA, P. R, *et al.* Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. **Int J Parasitol** v.38, p. 809-817, 2008.
- WINDDWS, J. *et al.* Scope for growth and contaminant levels in North Sea mussels *Mitilus edulis*. **Marine Ecology- progress series**. n.127, p. 131-148, 1995.
- XIAO, L.; FAYER, R., Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1239-1255, 2008.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. *Cryptosporidium* taxonimy: Recent advances and Implications for public health. **Clinical Microbiological Reviews**. v.17, n.1, p.72-92. 2004.

XIAO, L.; FENG Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunologic Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p.309-323, 2008.

XIAO, L.; RYAN, U.M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Current Opinion in Infection Diseases**, v. 17, p. 483–90, 2004.

XIAO, L.; . MORGAN, U. M; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R. C. A. FAYER, R. Genetic Diversity within *Cryptosporidium parvum* and Related *Cryptosporidium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3386–3391, 1999.

ZALI, M R, MEHR, A J, REZAIAN M, MEAMAR A R, VAZIRI S, MOHRAZ M
Prevalence of Prevalence of intestinal parasitic pathogens among HIV-positive individuals in Iran. **Japanese Journal of Infectious Diseases** v.57, p. 268-277, 2004.

ANEXOS

ANEXO A - Alinhamento das seqüências das 15 amostras de mexilhões *Perna perna* positivas para *Cryptosporidium*, através da amplificação do gene *18SSUrRNA*, a partir das sequencias depositadas no GenBank de *C. meleagridis*, *C. parvum* e *C. andersoni*; respectivamente: AF112574, AF164102 e AY954885. Onde * indicam posições totalmente conservadas; : indica conservação entre os grupos de propriedades de forte semelhança; . indica conservação entre grupos de propriedades de fraca semelhança; **█** indica polimorfismo entre 2 espécies; **↑** indica polimorfismo entre as 3 espécies; bases em vermelho: mudanças intraespecíficas; Bases em cinza: mudanças interespecíficas.

```

C.meleagridis_AF112574      TAATAACTTTACGGATCACAAT--TTATGTGACATATCATTCAAAGTTTCT 48
Amostra_1                  TAATAACTTTACGGATCACAAT--TTATGTGACATATCATTCAAAGTTTCT 48
Amostra_4                  TAATAACTTTACGGATCACAAT--TTATGTGACATATCATTCAAAGTTTCT 48
Amostra_21                 TAATAACTTTACGGATCACAAT--TTATGTGACATATCATTCAAAGTTTCT 48
C.parvum_AF164102         TAATAACTTTACGGATCACAAT--AAATGTGACATATCATTCAAAGTTTCT 48
Amostra_23                 TAATAACTTTACGGATCACAAT--AAATGTGACATATCATTCAAAGTTTCT 48
Amostra_19                 TAATAACTTTACGGATCACAAT--AAATGTGACATATCATTCAAAGTTTCT 48
Amostra_18                 TAATAACTTTACGGATCACAAT--AAATGTGACATATCATTCAAAGTTTCT 48
Amostra_3                  TAATAACTTTACGGATCACAAT--AAATGTGACATATCATTCAAAGTTTCT 48
Amostra_22                 TAATAACTTTACGGATCACAAT--AAATGTGACATATCATTCAAAGTTTCT 48
C.andersoni_AY954885     TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGGACATATCATTCAAAGTTTCT 50
Amostra_13                 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGGACATATCATTCAAAGTTTCT 50
Amostra_10                 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGGACATATCATTCAAAGTTTCT 50
Amostra_5                  TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGGACATATCATTCAAAGTTTCT 50
Amostra_11                 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGGACATATCATTCAAAGTTTCT 50
Amostra_15                 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGGACATATCATTCAAAGTTTCT 50
Amostra_16                 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGGACATATCATTCAAAGTTTCT 50
Amostra_17                 TAATAACTTTACGGATCGCATCTCTGATGGACATATCATTCAAAGTTTCT 50
*****
                               █
C.meleagridis_AF112574      GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
Amostra_1                  GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
Amostra_4                  GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
Amostra_21                 GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
C.parvum_AF164102         GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
Amostra_23                 GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
Amostra_19                 GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
Amostra_18                 GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
Amostra_3                  GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
Amostra_22                 GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGG 98
C.andersoni_AY954885     GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Amostra_13                 GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Amostra_10                 GACCTATCAGCTTTAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Amostra_5                  GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Amostra_11                 GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Amostra_15                 GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Amostra_16                 GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
Amostra_17                 GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGG 100
*****
C.meleagridis_AF112574      GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 148
Amostra_1                  GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 148
Amostra_4                  GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 148
Amostra_21                 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 148
C.parvum_AF164102         GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 148
Amostra_23                 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 148
Amostra_19                 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 148
Amostra_18                 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 148
Amostra_3                  GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 148
Amostra_22                 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 148
C.andersoni_AY954885     GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 150
Amostra_13                 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 150
Amostra_10                 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 150
Amostra_5                  GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 150
Amostra_11                 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 150
Amostra_15                 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 150
Amostra_16                 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 150
Amostra_17                 GTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCT 150
*****

```

C.meleagridis_AF112574 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTAAATACA 198
 Amostra_1 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTAAATACA 198
 Amostra_4 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTAAATACA 198
 Amostra_21 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTAAATACA 198
 C.parvum_AF164102 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTAAATACA 198
 Amostra_23 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTAAATACA 198
 Amostra_19 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTAAATACA 198
 Amostra_18 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTAAATACA 198
 Amostra_3 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTAAATACA 198
 Amostra_22 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTAAATACA 198
 C.andersoni_AY954885 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGAGACA 200
 Amostra_13 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGAGACA 200
 Amostra_10 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGAGACA 200
 Amostra_5 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGAGACA 200
 Amostra_11 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGAGACA 200
 Amostra_15 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGAGACA 200
 Amostra_16 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGAGACA 200
 Amostra_17 ACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCTGAGACA 200

C.meleagridis_AF112574 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 248
 Amostra_1 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 248
 Amostra_4 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 248
 Amostra_21 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 248
 C.parvum_AF164102 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 248
 Amostra_23 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 248
 Amostra_19 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 248
 Amostra_18 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 248
 Amostra_3 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 248
 Amostra_22 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 248
 C.andersoni_AY954885 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 250
 Amostra_13 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 250
 Amostra_10 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 250
 Amostra_5 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 250
 Amostra_11 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 250
 Amostra_15 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 250
 Amostra_16 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 250
 Amostra_17 GGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGT TTTGTAATT 250

C.meleagridis_AF112574 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 Amostra_1 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 Amostra_4 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 Amostra_21 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 C.parvum_AF164102 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 Amostra_23 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 Amostra_19 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 Amostra_18 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 Amostra_3 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 Amostra_22 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 298
 C.andersoni_AY954885 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Amostra_13 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Amostra_10 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Amostra_5 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Amostra_11 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Amostra_15 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Amostra_16 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 300
 Amostra_17 GGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAGATCAATTGGAGGGCAAGT 300

C.meleagridis_AF112574 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 348
 Amostra_1 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 348
 Amostra_4 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 348
 Amostra_21 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 348
 C.parvum_AF164102 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 348
 Amostra_23 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 348
 Amostra_19 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 348
 Amostra_18 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 348
 Amostra_3 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 348
 Amostra_22 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 348
 C.andersoni_AY954885 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 350
 Amostra_13 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 350
 Amostra_10 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 350
 Amostra_5 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 350
 Amostra_11 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 350
 Amostra_15 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 350
 Amostra_16 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 350
 Amostra_17 CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGT 350

C.meleagridis_AF112574 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTT-AATAATTTATATA 397
 Amostra_1 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTT-AATAATTTATATA 397
 Amostra_4 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTT-AATAATTTATATA 397
 Amostra_21 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTT-AATAATTTATATA 397
 C.parvum_AF164102T TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTT-AATAATTTATATA 397
 Amostra_23 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTT-AATAATTTATATA 397
 Amostra_19 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTT-AATAATTTATATA 397
 Amostra_18 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTT-AATAATTTATATA 397
 Amostra_3 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTT-AATAATTTATATA 397
 Amostra_22 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTT-AATAATTTATATA 397
 C.andersoni_AY954885 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTATAATTT----A 396
 Amostra_13 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTATAATTT----A 397
 Amostra_10 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTATAATTT----A 396
 Amostra_5 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTATAATTT----A 396
 Amostra_11 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTATAATTT----A 396
 Amostra_15 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTATAATTT----A 396
 Amostra_16 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTATAATTT----A 396
 Amostra_17 TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTATAATTT----A 396

C.meleagridis_AF112574 TAATATT-GATTAATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTAA 446
 Amostra_1 TAATATT-GATTAATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTAA 446
 Amostra_4 TAATATT-GATTAATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTAA 446
 Amostra_21 TAATATT-GATTAATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTAA 446
 C.parvum_AF164102 AAATATTTGATGAATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTAT 447
 Amostra_23 AAATATTTGATGAATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTAT 447
 Amostra_19 AAATATTTGATGAATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTAT 447
 Amostra_18 AAATATTTGATGAATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTAT 447
 Amostra_3 AAATATTTGATGAATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTAT 447
 Amostra_22 AAATATTTGATGAATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTAT 447
 C.andersoni_AY954885 TAATATTACCAAGGTAATTATATATTAATCAACATCCTTCCATATTATAT 446
 Amostra_13 TAATATTACCAAGGTAATTATATATTAATCAACATCCTTCCATATTATAT 447
 Amostra_10 TAATATTACCAAGGTAATTATATATTAATCAACATCCTTCCATATTATAT 446
 Amostra_5 TAATATTACCAAGGTAATTATATATTAATCAACATCCTTCCATATTATAT 446
 Amostra_11 TAATATTACCAAGGTAATTATATATTAATCAACATCCTTCCATATTATAT 446
 Amostra_15 TAATATTACCAAGGTAATTATATATTAATCAACATCCTTCCATATTATAT 446
 Amostra_16 TAATATTACCAAGGTAATTATATATTAATCAACATCCTTCCATATTATAT 446
 Amostra_17 TAATATTACCAAGGTAATTATATATTAATCAACATCCTTCCATATTATAT 446

C.meleagridis_AF112574 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 645
 Amostra_1 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 645
 Amostra_4 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 645
 Amostra_21 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 645
 C.parvum_AF164102 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 646
 Amostra_23 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 646
 Amostra_19 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 646
 Amostra_18 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 646
 Amostra_3 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 646
 Amostra_22 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 646
 C.andersoni_AY954885 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 644
 Amostra_13 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 645
 Amostra_10 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 644
 Amostra_5 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 644
 Amostra_11 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 644
 Amostra_15 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 644
 Amostra_16 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 644
 Amostra_17 GGGCATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTGTTAAAGA 644

C.meleagridis_AF112574 CAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 695
 Amostra_1 CAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 695
 Amostra_4 CAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 695
 Amostra_21 CAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 695
 C.parvum_AF164102 CAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 696
 Amostra_23 CAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 696
 Amostra_19 CAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 696
 Amostra_18 CAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 696
 Amostra_3 CAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 696
 Amostra_22 CAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 696
 C.andersoni_AY954885 CGAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 694
 Amostra_13 CGAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 694
 Amostra_10 CGAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 694
 Amostra_5 CGAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 694
 Amostra_11 CGAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 694
 Amostra_15 CGAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 694
 Amostra_16 CGAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 694
 Amostra_17 CGAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCTTAATCAAGAACG 694

C.meleagridis_AF112574 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 724
 Amostra_1 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 724
 Amostra_4 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 724
 Amostra_21 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 724
 C.parvum_AF164102 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 725
 Amostra_23 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 725
 Amostra_19 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 725
 Amostra_18 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 725
 Amostra_3 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 725
 Amostra_22 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 725
 C.andersoni_AY954885 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 723
 Amostra_13 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 724
 Amostra_10 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 723
 Amostra_5 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 723
 Amostra_11 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 723
 Amostra_15 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 723
 Amostra_16 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 723
 Amostra_17 AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATA 723
