



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**Sofia Aline Amaral Santos**

**Pesquisa de protozoários Apicomplexa em ostras *Crassostrea rhizophorae*,  
Guilding, 1828 (Bivalvia: Ostreidae) da Baía de Todos os Santos – Bahia**

Feira de Santana

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**Sofia Aline Amaral Santos**

**Pesquisa de protozoários Apicomplexa em ostras *Crassostrea rhizophorae*,  
Guilding, 1828 (Bivalvia: Ostreidae) da Baía de Todos os Santos – Bahia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zoologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva

Feira de Santana

2014

## Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Santos, Sofia Aline Amaral  
S238p Pesquisa de protozoários Apicomplexa em ostras *Crassostrea rhizophorae*, Guilding, 1828 (Bivalvia: Ostreidae) da Baía de Todos os Santos - Bahia / Sofia Aline Amaral Santos. – Feira de Santana, 2014.  
67 f.: il.

Orientador: Aristeu Vieira da Silva.

Mestrado (dissertação) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, 2014.

1. *Crassostrea rhizophorae* – Baía de Todos os Santos. 2. Ostras. 3. Apicomplexa. 4. Protozoários. I. Silva, Aristeu Vieira da, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 594.11

**Sofia Aline Amaral Santos**

**Pesquisa de protozoários Apicomplexa em ostras *Crassostrea rhizophorae*, Guilding, 1828  
(Bivalvia: Ostreidae) da Baía de Todos os Santos – Bahia**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zoologia pelo Programa de Pós-graduação em Zoologia da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/2014

BANCA EXAMINADORA

---

PROF. DR. ARISTEU VIEIRA DA SILVA (ORIENTADOR)  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

---

PROF. DR. GEORGE REGO DO ALBUQUERQUE  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ (UESC)

---

PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. SIMONE SOUZA DE OLIVEIRA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA (UEFS)

*À minha mãe e ao meu pai (in memoriam)*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida, fé, saúde, perseverança e por enviar anjos, em forma de pessoas, que me acompanharam e contribuíram na conclusão desta etapa tão importante na minha vida;

À minha mãe, irmãs (os) e sobrinhas (os), que mesmo não entendendo a AUSÊNCIA emitiram energia positiva sempre;

Ao Professor Aristeu pelo sim a orientação, paciência, ensinamentos, que com certeza levarei para sempre, e a preocupação em estar sempre por perto;

À Patrícia Arcanjo amiga, companhia indispensável, que da sua forma me ajudou a estar sempre em busca do “equilíbrio”, com certeza os momentos bons e ruins vividos, durante esta etapa, farão parte da nossa história de vida;

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas e do Grupo de Pesquisa em Zoonoses e Saúde Pública: Dora, Selma Gomes, Joelande, Alany, Cinthia, Luciara, Aline, Patrícia, aos bolsistas de iniciação científica: Luana, Priscyla, Jadson e Kathllen; aos estagiários ‘veteranos’: Jefferson, Mariane, Milena, Maiara e Verônica.

Aos funcionários do LABIO;

A Eduardo Rodrigues (Bahia Pesca) pela atenção, apoio e indicação em relação aos pontos de coleta;

À equipe do Escritório da Superintendência de Pesca e Aquicultura do Estado da Bahia;

À Fatima, responsável pelos cultivos em Vera Cruz, pelo acolhimento e atenção dedicada a cada coleta;

A todos da comunidade de Kaonge, Santiago do Iguape, especialmente a Seu Nico e Selma, pela atenção e acompanhamento nas coletas nos cultivos da comunidade;

Ao professor Alexandre Clístenes e a todos os funcionários e alunos de pós-graduação e de iniciação científica do LABICTIO-UEFS.

À professora Elinalva, Gisele e demais funcionários e alunos de pós-graduação e de iniciação científica do LAMASP-UEFS.

Ao professor Hélio, a amiga Su (Suzana) pelas liberações, a Gorete pela disponibilidade, amizade, alunos de iniciação científica, principalmente a Marcelo pela “disponibilidade” do BIOMOL e alunos de pós-graduação do LAPEM-UEFS

Ao professor Eddy Francisco, pelo apoio, preocupação, atenção dispensados durante todo o tempo em que nos ocupamos do laboratório e até “atrapalhamos” os trabalhos; a Adinoelson Neto e Matheus Nolasco, também a vocês, obrigada pelos momentos de descontração, atenção, debates sobre as “benditas PCRs” e demais professores e alunos de pós-graduação e de iniciação científica do LENT-UEFS.

Ao professor Cássio, funcionários, alunos de pós-graduação e de iniciação científica do LAMOL-UEFS.

Ao corpo docente e funcionários Agripino e Mara do programa de pós graduação em Zoologia;

À Coordenação de pós graduação da Universidade Estadual de Feira de Santana;

À Tânea Arcanjo, Paulo, Egmea pelo acolhimento e atenção em Ilhéus e também a Fel pelos importantes momentos de descontrações e discussões sobre a vida de mestranda;

Ao Professor George Albuquerque, a Bianca Maciel, Luana Ribeiro, aos alunos de iniciação científica, de pós-graduação e professores dos Laboratórios de Virologia, Parasitologia, Toxicologia, Genética, Bactérias anaeróbicas do Hospital Veterinário da UESC, sua equipe de limpeza, da copa e da portaria;

À Daniele de Santana Rocha, pela companhia, disponibilidade, atenção, amizade, aprendizado dentro e fora dos laboratórios, não menos importante, as caronas..até mesmo para ir ao Shopping Jequitibá;

À Mariane Luz pelas conversas sobre *Crassostrea*;

À Kennedy Novais, pela companhia no Solar das Oliveiras, pela atenção, pelos rápidos e importantes momentos turísticos em Ilhéus;

Ao professor Dr.Rodrigo M. Soares do Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelos controles positivos de *Cryptosporidium Canis*;

Ao Dr. Rodrigo C. da Silva do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, pelos controles positivos de *Toxoplasma gondii*;

Ao professor Dr.Luiz Fernando Pitta Gondim e ao Miller do Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais da Universidade Federal da Bahia, pelos controles positivos de *Hammondia hammondi*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona*;

Aos colegas de mestrado, 'mais chegados' Laila, Renata, Gilvana, Thales, e os demais; aos 'agregados' Claudia, Janete Jane, Mazinho, pelos momentos sociais tão importantes durante esta jornada;

Às primas-amigas que não se conformaram e não se conformam em terem sido 'trocadas', momentaneamente pelas 'ostrinhas'.

À minha 'família feirense' Tio Gena, Tia Dete e amiga-irmã Simone;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta etapa tão importante para minha vida MUITO OBRIGADA !!!!!

*"Valeu a pena? Tudo vale a pena se a alma não é  
pequena. Quem quer passar além do bojador tem  
que passar além da dor. Deus ao mar o perigo e o  
abismo deu, mas nele é que espelhou o céu".*

*(Fernando Pessoa)*

## RESUMO

A presença de oocistos de protozoários patogênicos nas águas costeiras, resultantes da introdução de fezes contaminadas de humanos e de animais, tem sido registrada em diferentes regiões do mundo. Moluscos bivalves como ostras podem filtrar e reter em seus tecidos protozoários encistados e assim atuar como potenciais transmissores de formas parasitárias capazes de provocar doenças como a criptosporidiose e a toxoplasmose. O objetivo deste trabalho foi detectar contaminação natural de ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* cultivadas em áreas de influência da baía de Todos os Santos por protozoários Apicomplexa (*Cryptosporidium* e *Toxoplasma gondii*). Um total de 615 ostras foi coletado em cinco pontos de dois municípios no período de janeiro a abril de 2013. Brânquias e glândulas digestivas foram dissecadas e agrupadas em pools de 3 animais, resultando em 205 amostras de brânquias e 205 amostras de glândulas. Para a detecção molecular, o DNA das amostras teciduais foi extraído, em seguida foi realizada uma *nested*-PCR para a detecção do material genético do *Cryptosporidium* e uma outra para detecção do DNA do Sarcocystidae, afim de amplificar fragmentos de 600 e 290 pares de base, respectivamente. Não houve detecção de DNA de *Cryptosporidium* nas amostras analisadas. Material genético de *T. gondii*, determinado pela PCR-RFLP, foi amplificado em 32 (7,8%) amostras teciduais de ostras, havendo diferença significativa de positividade em dois pontos de coleta. Um dos fatores que pode estar relacionado com esse achado é a proximidade destes pontos a locais de lchivamento de solos contendo fezes de animais provenientes de fazendas. Com esses resultados podemos inferir que há contaminação do ambiente aquático e um risco de transmissão de oocistos através do consumo das ostras produzidas nestas regiões, o que é uma alerta para o sistema de saúde pública.

**Palavras-chave:** Ostra. *Cryptosporidium*. *Toxoplasma*. Apicomplexa. PCR.

## ABSTRACT

The presence of oocysts of pathogenic protozoa in coastal waters resulting from the introduction of humans and animals contaminated feces has been recorded in different regions of the world. Bivalve molluscs such oysters can filter and retain in their tissues encysted protozoa and so act as potential transmitter of parasitic forms capable of causing diseases like toxoplasmosis and cryptosporidiosis. The aim of this study was to detect natural contamination in oysters of the species *Crassostrea rhizophorae*, grown in areas at the influence of de Todos os Santos Bay, Apicomplexa protozoan (*Cryptosporidium* and *Toxoplasma gondii*). A total of 615 oysters were collected from five points in two municipalities in the period from January to April 2013. Gills and digestive glands were dissected and grouped in pools of 3 animals, then resulted in 205 samples of gills and 205 samples of glands. For the molecular detection in tissue samples, DNA was extracted, then a nested-PCR was performed for the detection of genetic material of *Cryptosporidium* and another for detection of Sarcocystidae in order to amplify fragments of 600 and 290 base pairs, respectively. There was no DNA detection of *Cryptosporidium* in samples analysed. Genetic material compatible to *T. gondii* was amplified in 32 (7,8%) oyster tissue samples, and there are significant differences in the presence of positivity at two points of collecting. One of the factors that may be related with this finding is the proximity of these points to a location of soils washing containing feces of animals from farms. With these results we can infer that there is contamination of the aquatic environment and a risk of transmission of oocysts through consumption of oysters produced in these regions, which is an alert to the public health system.

**Key-words:** Oyster. *Cryptosporidium*. *Toxoplasma*. Apicomplexa. PCR.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Localização dos pontos de coleta de *Crassostrea rhizophorae*. Feira de Santana, BA. 2013. A) Localização do Estado da Bahia dos pontos de coleta na Baía de Todos os Santos (BTS) e na Baía de Iguape (BI). B) Detalhe da localização dos pontos de coleta na BTS. C) Detalhe dos pontos de coleta na BI. .... 33
- Figura 2. Área de manguezal no município de Vera Cruz. Seta à esquerda indica a área de cultivo de *Crassostrea rhizophorae*. Feira de Santana, BA. 2013. .... 34
- Figura 3. Área de cultivo de *Crassostrea rhizophorae* em ponto de coleta do município de Vera Cruz. Feira de Santana, BA. 2013. .... 35
- Figura 4. Área de manguezal no município de Cachoeira. Feira de Santana, BA. 2013. .... 35
- Figura 5. Processamento de ostras *Crassostrea rhizophorae* para obtenção de amostras teciduais. Feira de Santana, BA. 2013. .... 36
- Figura 6. Gel de eletroforese em agarose a 2% dos produtos da *nested* reação em cadeia pela polimerase para detecção de DNA de *Cryptosporidium* spp em amostras de brânquias e glândulas digestivas de *Crassostrea rhizophorae* coletadas nos municípios de Vera Cruz e Cachoeira, BA. Feira de Santana, 2013. .... 43
- Figura 7. Gel de eletroforese em agarose a 2% dos produtos da reação em cadeia pela polimerase para detecção de DNA de Sarcocystidae em amostras de brânquias e glândulas digestivas de *Crassostrea rhizophorae* coletadas nos municípios de Vera Cruz e Cachoeira, BA. Feira de Santana, 2013. .... 44
- Figura 8. Gel de eletroforese em agarose a 3% dos produtos da PCR-RFLP para detecção de DNA de Sarcocystidae em amostras de brânquias e glândulas digestivas de *Crassostrea rhizophorae* coletadas nos municípios de Vera Cruz e Cachoeira, BA. Feira de Santana, 2013. .... 45
- Figura 9. Frequência relativa e intervalo de confiança 95% de positivos a reação em cadeia pela polimerase para a detecção de DNA compatível com *Toxoplasma gondii* em grupos de tecidos de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em dois municípios banhados pela Baía de Todos os Santos, BA, segundo os pontos de coleta. Feira de Santana, 2013. .... 46

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Frequência absoluta (Fi), relativa (fi) e relativa acumulada (fia) de espécimes de *Crassostrea rhizophorae* coletados, segundo o município e ponto de coleta. Feira de Santana, 2013. .... 42
- Tabela 2. Frequência absoluta (N) e relativa (%) dos resultados da reação em cadeia pela polimerase para a detecção de DNA compatível com *Toxoplasma gondii* em grupos de tecidos de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em dois municípios banhados pela Baía de Todos os Santos, BA. Feira de Santana, 2013. .... 45
- Tabela 3. Frequência absoluta (N), frequência relativa (%) e intervalo de confiança 95% (IC95% positivos) dos resultados da reação em cadeia pela polimerase para a detecção de DNA de *Apicomplexa* em grupos de tecidos de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em dois municípios banhados pela Baía de Todos os Santos, BA, segundo os pontos de coleta. Feira de Santana, 2013..... 46
- Tabela 4. Média do comprimento total (Ct) em cm, média da massa total (Mt), da massa da glândula digestiva e da massa da brânquia em g, porcentagem de brânquias (PB) e glândulas (PG) positivas para a presença de DNA compatível com *Toxoplasma gondii* em grupos de ostras *Crassostrea rhizophorae*, segundo o Município e pontos de coleta de amostras. Feira de Santana, 2013. .... 47
- Tabela 5. Análise de correlação entre variáveis morfométricas (Ct – comprimento total, Mt – massa total, Mb – massa das brânquias, Mg – massa das glândulas digestivas) e a frequência relativa de positivos para a detecção de DNA compatível com *Toxoplasma gondii* em grupos de glândulas digestivas (PG) e brânquias (PB) de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em dois municípios banhados pela Baía de Todos os Santos, BA. Feira de Santana, 2013..... 47
- Tabela 6. Comparação entre os resultados da detecção de DNA de compatível com *Toxoplasma gondii* em grupos de tecidos de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em dois municípios banhados pela Baía de Todos os Santos, BA, segundo os órgãos avaliados. Feira de Santana, 2013. .... 48
- Tabela 7. Estatísticas descritivas da avaliação biométrica de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em Vera Cruz, BA, segundo a coleta. Feira de Santana, 2013. .... 66
- Tabela 8. Estatísticas descritivas da avaliação biométrica de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em Cachoeira, BA, segundo a coleta. Feira de Santana, 2013. .... 67

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
REVISÃO DA LITERATURA.....	17
Moluscos bivalves.....	17
<i>Crassostrea rhizophorae</i> Guilding, 1828 (Bivalvia: Ostreidae).....	18
Importância dos moluscos bivalves como veiculadores de protozoários patogênicos.....	19
<i>Cryptosporidium</i> spp.....	24
<i>Toxoplasma gondii</i> .....	26
OBJETIVOS.....	32
Objetivo Geral.....	32
Objetivos Específicos.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Área de Estudo.....	33
Coleta dos espécimes.....	34
Preparo das amostras.....	36
Extração e precipitação de DNA.....	37
Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção de Apicomplexa.....	39
Pesquisa de DNA de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	39
Pesquisa de DNA de Sarcocystidae.....	39
Eletroforese e registro dos produtos de amplificação.....	40
Análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição do DNA.....	40
Análise dos resultados.....	41
RESULTADOS.....	42
Coleta de amostras e biometria.....	42
Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção de Apicomplexa.....	43
Pesquisa de DNA de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	43
Pesquisa de DNA de Sarcocystidae.....	43
Análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição do DNA.....	44
DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO.....	66

## INTRODUÇÃO

Atividades como desmatamento de matas ciliares, agricultura, urbanização acelerada e desenvolvimento industrial, entre outras contribuem para a degradação dos mananciais e poluição dos recursos hídricos (SALATI et al, 2002) o que se torna um agravante, visto que a capacidade de corpos hídricos neutralizarem os efeitos adversos provocados por tais atividades é limitada (UN-WATER, 2006). Para Franco et al (2012) a ocorrência de protozoários patogênicos de veiculação hídrica introduzidos, geralmente, por esgotos domésticos, é registrada em recursos hídricos em todo o mundo e representa um desafio para os sistemas produtores e distribuidores de água. Além disso, a utilização da água contaminada e de recursos naturais dela proveniente (peixes, moluscos, crustáceos) constitui-se num importante ponto a ser considerado pela saúde pública, devido o risco de epidemias (CARROZZO, 1994).

Protozoários patogênicos de transmissão hídrica como *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*, tem sido detectados mundialmente em águas superficiais e marinhas (SLIFKO et al, 2000; FAYER et al, 2004; DUMÈTRE et al, 2012; PALOS LADEIRO et al, 2013). Fayer et al (2004), se refere a tais protozoários como principais parasitos relacionados com surtos de veiculação hídrica. No entanto, mesmo que estes protozoários influenciem na avaliação da qualidade da água e ofereçam risco à saúde humana, apenas microorganismos como vírus e bactérias tem sido amplamente estudado quando se refere ao controle de qualidade da água (PALOS LADEIRO et al, 2013).

Para a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010), *Cryptosporidium* é um dos parasitos intestinais mais difundidos e causa comum de diarreia grave em pessoas imunocomprometidas e em crianças.

A rota de transmissão de *C.parvum* é fecal/oral, e ocorre por meio da ingestão de alimentos ou água contaminados com suas formas infectantes (MONIS, THOMPSON, 2003). A transmissão de *T.gondii* pode ocorrer pelas três formas do ciclo de vida do agente: oocistos esporulados: via oral pela ingestão de água ou alimento contaminados com oocistos presentes no ambiente eliminados nas fezes de felídeos;

bradizoítos: via ingestão de cistos teciduais através da ingestão de carnes cruas oriundas de hospedeiros intermediários; e taquizoítos: via uterina pela transmissão transplacentária (TENTER et al, 2000; FAYER et al, 2004; FERREIRA et al, 2013).

Ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae*, Guilding, 1828, (Bivalvia: Ostreidae), popularmente conhecida como ostra do mangue, são naturalmente distribuídas em águas costeiras do Caribe ao Uruguai e possui o hábito de viver aderida a substratos duros e alimentam-se de plâncton e detritos em suspensão na água através do processo de filtração realizado pelas brânquias.

Desta forma, a fisiologia destes animais pode contribuir para o acometimento de infecções por diferentes microorganismos patogênicos em humanos, uma vez que a presença destes patógenos no ambiente costeiro, onde estes indivíduos se desenvolvem, pode resultar na concentração dos mesmos nas brânquias e ou nas glândulas digestivas de moluscos bivalves (POTASMAN et al, 2002; ROBERTSON, 2007).

Por este motivo, partículas presentes na água, como oocistos de *Cryptosporidium* spp e *T. gondii* podem ser retidos nos tecidos dos bivalves, e ao serem consumidos crus ou mal cozidos oferecer risco de aquisição de protozooses. Ainda assim, segundo Palos Ladeiro et al (2013) a concentração de oocistos destes protozoários em animais filtradores, como os bivalves, tem sido negligenciada. Assim, o monitoramento da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp e de *T. gondii*, em ostras, é importante, pois permite verificar se o consumo das mesmas pode oferecer risco à saúde humana, servindo assim como potenciais transmissores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), que constituem sério problema de saúde pública (LEAL, FRANCO, 2008), além de servir como bioindicadores da insalubridade da água.

## REVISÃO DA LITERATURA

### Moluscos bivalves

Os moluscos bivalves são animais invertebrados aquáticos representantes do filo Mollusca e pertencentes à classe Bivalvia, também conhecida como Pelecypoda ou Lamellibranchia, e abrange animais como ostras, mexilhões, vieiras, mariscos. Os moluscos bivalves são comprimidos lateralmente e apresentam uma concha composta por duas valvas, unidas por um ligamento de dobradiça que se prendem e se articulam dorsalmente, envolvendo todo o corpo. O pé é comprimido lateralmente, a cabeça é mal desenvolvida e a cavidade do manto é a mais espaçosa do que qualquer classe de moluscos. As brânquias comumente são muito grandes e assumem na maioria das espécies função de coleta de alimentos além de realizar a troca gasosa. A maioria das características comuns a estes organismos permitiram aos mesmos tornarem-se escavadores de fundos macios e, embora bivalves modernos tenham alcançado outros habitats, o hábito sésil destes organismos prevalece (RUPPERT, BARNES, 1996).

Nesta classe, as trocas gasosas ocorrem através do manto e das brânquias, sendo estas altamente modificada para o hábito alimentar filtrante, assim a corrente respiratória traz tanto oxigênio como matéria orgânica (HICKMAN et al, 2001), desta forma os bivalves podem ser subdivididos em três grupos devido à característica das brânquias: protobrânquios, septibrânquios e lamelibrânquios. Acredita-se que os primeiros sejam os mais primitivos dos bivalves existentes, enquanto o último representa a maioria das espécies de bivalves, e aqueles considerados altamente especializados pertencem ao grupo dos septibrânquios (RUPPERT, BARNES, 1996).

Predominantemente marinhos, estes organismos podem processar grandes volumes de água por meio da filtração, e assim os detritos e microorganismos presentes podem ser utilizados como fonte de alimentos. Desta forma, os seres humanos ao ingeri-los crus ou parcialmente cozidos podem contrair diversas doenças quando microorganismos patogênicos como bactérias, vírus e protozoários estão presentes nos locais de coleta e produção destes animais, pois ao serem filtrados pelas brânquias e aí ficar

retidos podem, posteriormente, também serem encontrados em altas concentrações nas glândulas digestivas (POTASMAN et al, 2002).

Existem aproximadamente 8.500 espécies de moluscos bivalves marinhos descritas em todo o mundo (POTASMAN et al, 2002; ROBERTSON, 2007). Aqueles de maior interesse econômico do litoral brasileiro são representados pelas ostras *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), a ostra-do-mangue e *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), a ostra-do-Pacífico (Ostreidae); pelos mariscos *Perna perna* (Linnaeus, 1758), *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) e *Mytella falcata* (Orbigny, 1846) (Mytilidae); pela lambreta, *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791) (Lucinidae); pelo moapem ou unha-de-velha, *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) (Psammobiidae); pelo berbigão ou maçunim, *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) (Veneridae); e pela vieira *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (BOEHS et al, 2011).

#### ***Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828 (Bivalvia: Ostreidae)**

Popularmente conhecida como ostra do mangue ou ostra nativa, a *Crassostrea rhizophorae* é um molusco bivalve de origem da América do Sul e encontra-se distribuída ao longo da costa brasileira, principalmente nos estados do nordeste. Apresenta coloração variando do branco ao cinza escuro, possui uma das conchas sempre fixa ao substrato, podendo ser encontrada fixa às raízes aéreas das vegetações de mangue, principalmente de *Rhizophorae mangle*, assim como também na faixa entre marés nos costões rochosos ou bancos submersos (GONÇALVES et al, 2007).

Pode ser classificada como uma espécie eurihalina e osmoconformadora, adaptada para ambientes com salinidades de 0 a 40 ppt (ótimo entre 7,2 e 28,8 ppt) (NASCIMENTO, 1991). São animais dióicos e ovíparos, mas não apresentam dimorfismo sexual, com capacidade de filtração em torno de 90 a 100 litros de água do mar por dia (CUÑA CASASBELLAS, 1991).

Segundo Rios (1994) a taxonomia da *C. rhizophorae* se dá da seguinte forma:

Reino Animalia

Filo Mollusca

Classe Bivalvia

Ordem Ostreoida

Família Ostreidae

Gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897)

Espécie *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828)

### **Importância dos moluscos bivalves como veiculadores de protozoários patogênicos**

A distribuição mundial de diferentes bivalves, seu hábito de vida sésil e a eficiência do seu comportamento filtrador tornam esses organismos susceptíveis a bioacumular poluentes e patógenos (RIPPEY, 1994; SAUVÉ et al, 2000) como bactérias, vírus e/ ou protozoários presentes na água, provenientes de contaminação fecal de origem humana e animal (SCHETS et al, 2007), atuando assim, como importantes bioindicadores nos ambientes aquáticos (RIPPEY,1994; SAUVÉ et al, 2000; PALOS LADEIRO et al, 2013). Deste modo, águas contaminadas com oocistos de protozoários patogênicos, como *Cryptosporidium* e *Toxoplasma*, aumentam o risco da infecção de humano com a ingestão de moluscos bivalves crus ou mal cozidos (DOWNEY, GRACZYK, 2007; ROBERTSON, 2007; SMITH, NICHOLS, 2010).

Embora pesquisas sobre a presença de oocistos de *Cryptosporidium* na água marinha não sejam tão freqüentes, o protozoário já foi detectado em praias e regiões estuarinas de algumas regiões do mundo (ROBERTSON, GJERDE, 2007), também oocistos de *Toxoplasma gondii*, vem sendo detectado em mamíferos marinhos sugerindo a presença de

vias de contaminação dos ambientes marinhos, principalmente através do escoamento da água da chuva sobre superfície terrestre em direção aos corpos hídricos (MILLER et al 2008).

A circulação de patógenos como *Cryptosporidium* e *Toxoplasma* em fontes ambientais depende da interação do parasito com o ambiente no qual está inserido, neste sentido a transmissão ambiental depende de propriedades físico-químicas de seus oocistos que permitem transporte, retenção e sobrevivência por meses em água, solos, vegetais e moluscos, que são as principais fontes de infecção humana (DUMETRE et al, 2012).

Para Willis et al (2013) a presença de oocistos circulando em ambientes aquáticos e surtos documentados em diferentes países em todo o mundo, tem atraído a atenção para a transmissão de patógenos para humanos através de moluscos contaminados. Embora pesquisas de protozoários com potencial zoonótico em moluscos sejam limitadas, estudos confirmam a presença destes parasitos em animais de pecuária e fontes de águas contaminadas. Em vista disso Wills et al (2013) chamam a atenção para a necessidade de examinar a eficiência do saneamento atual e protocolos de depuração para prevenir o público da aquisição de criptosporidiose e outras zoonoses através do consumo de moluscos bivalves contaminados.

Muitas espécies e genótipos de *Cryptosporidium* infectam humanos, animais de companhia, de pecuária e selvagens em todo o mundo (XIAO, FAYER, 2008). Essas espécies e seus genótipos exibem um amplo espectro de diversidade biológica, diferindo em suas habilidades em infectar uma ou várias espécies hospedeiras e variando na prevalência da infecção entre e dentro dos países.

Experimentos com voluntários humanos demonstraram que a dose infectante é de nove a 1.042 oocistos, dependendo da cepa de *Cryptosporidium* (OKHUYSEN, CHAPPELL, 2002). Outro agravante é o grande potencial para a contaminação ambiental, pois um único bezerro infectado pode eliminar de um a 10 bilhões de oocistos nas fezes durante uma semana (FAYER et al, 2004). Neste sentido, a difusão de tais formas potencializa a transmissão de animais para humanos e vice-versa, além da permanência dos reservatórios e vetores de oocistos (THOMPSON, SMITH, 2011). Para o *Toxoplasma gondii* a dose infectante para um mamífero terrestre é de apenas um oocisto (DUBEY et al, 1997).

Para Smith et al (2007) os métodos microscópicos atuais que investigam contaminação de oocistos em água e alimentos tem limitações tecnológicas e isso leva a uma subestimação da contaminação quanto a quantidade e detecção de organismos não desejáveis, sem importância para a saúde pública. Em contrapartida, métodos moleculares oferecem soluções e informações na identificação de espécies e genótipos, possibilitando que, mesmo em amostras de alimentos e águas que contenham pequenas quantidades de eátágios infectantes, seja possível extrair o DNA e através de reação em cadeia pela polimerase (PCR) se alcance uma eficiente amplificação do material genético alvo (SMITH et al, 2007; WILLS et al, 2013).

Pesquisas em diferentes regiões do mundo têm sido realizadas buscando identificar infecções com oocistos de *Cryptosporidium* e de outros protozoários em diversos moluscos bivalves, dentre eles, ostras de várias espécies (WILLIS et al, 2013).

Gómez-Couso et al (2003) ao investigar a presença e viabilidade dos oocistos de *Cryptosporidium* em 241 moluscos cultivados, dentre eles, a ostra plana americana (*Ostrea edulis*), oriundos da costa da Galícia e outros países da União Européia, verificou a presença de oocistos em 83 amostras analisadas. Ainda buscando identificar oocistos, Gómez-Couso et al (2004) ao analisar 49 espécimes de moluscos bivalves, dentre eles a ostra plana americana (*Ostrea edulis*), foram verificadas presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em cerca de 50% dos organismos analisados.

Schets et al (2007) ao examinarem 179 ostras (*Crassostrea gigas*) comerciais e não comerciais da Holanda, para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. encontraram a presença do protozoário em nove das 133 espécimes não comerciais e em seis daquelas 46 destinadas ao consumo humano, representando uma média de 12% de positividade para as ostras analisadas, embora alguns autores relacionem a presença de *Cryptosporidium* em ostras com alta precipitação pluviométrica, já foi observado presença de oocistos deste protozoário em épocas em que precipitação foi normal. Desta forma, para Schets et al (2007), a relação entre a positividade e presença de temporadas pode ser justificada por haver aumento de contaminação da água superficial através do aumento do escoamento das terras e de emissários de efluentes.

Leal et al (2008), com o intuito de verificar a presença de protozoários patogênicos em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) cultivadas no litoral de São Paulo, Brasil, coletaram 120 espécimes e realizaram homogeneizados de brânquias e glândulas digestivas, para serem analisadas, e uma concentração estimada de 12 oocistos/por ostra foi verificada. Leal et al (2013) verificaram a qualidade sanitária da água da área e das ostras nativas (*Crassostrea brasiliiana*) cultivadas em uma área estuarina no Sudeste do Brasil, antes e depois do processo de depuração. Houve presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. apenas na água do tanque de depuração.

Souza et al (2012) a fim de diagnosticar o nível de contaminação das ostras do pacífico (*Crassostrea gigas*), da água e dos sedimentos quanto a parâmetros microbiológicos, químicos e bioquímicos, em uma região estuarina no Sul do Brasil, verificaram presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas brânquias das ostras.

Assim como os oocistos de *Cryptosporidium*, aqueles de *T.gondii* tem alcançado o ambiente aquático, principalmente devido ao escoamento de materiais contaminados com fezes de felídeos, que são seus hospedeiros definitivos, e assim tem infectado bivalves que conseqüentemente, por serem utilizados na cadeia alimentar no ambiente marinho, tem infectado mamíferos marinhos (ARKUSH et al, 2003; FAYER et al, 2004; PALOS LADEIRO et al, 2013).

Lindsay et al (2001) realizando experimentos com ostras da espécie *Crassostrea virginica*, verificaram a capacidade destes organismos em remover oocistos de *Toxoplasma gondii* da água na qual haviam inoculado número conhecidos de oocistos, e assim atuar como possíveis fontes de infecção de *T.gondii* para mamíferos marinhos e humanos.

Experimento semelhante foi realizado por (ARKUSH et al, 2003), com bivalve da espécie *Mytilus galloprovincialis* e houve também remoção da água contaminada e concentração de oocistos pelos organismos, e este fato sugere que estes moluscos bivalves podem ser os principais hospedeiros paratênicos no ambiente marinho, sendo então capazes de provocar infecção e doença nos mamíferos que deles se alimentam, como as lontras marinhas.

Miller et al (2008) puderam verificar a retenção de oocistos por diferentes espécies de bivalves, fortalecendo assim a idéia de que oocistos disseminados no ambiente através das fezes de hospedeiros definitivos chegam até o ambiente marinho por meio de escoamento provocados pelos eventos de precipitação (FAYER et al, 2004; MILLER et al, 2002), o que pode justificar portanto o alto índice de mamíferos marinhos infectados.

Estudo experimental conduzido por Palos Ladeiro et al (2014) determinaram a bioacumulação de oocisto de *T. gondii* por *Dreissena polymorpha*. No primeiro experimento determinou-se que dos moluscos bivalves expostos a 560 oocistos por dia, recupera-se cerca de 30 oocistos do parasito, e que a recuperação por molusco é dose dependente, sendo de 100% dos animais expostos a 200 e 560 oocistos por dia.

Esmerini et al (2010) investigaram a presença de DNA específico (gene B1) de *T. gondii* em ostras (*C. rhizophorae*) e mexilhões (*Mytella guyanensis*) vendidos em mercado público da cidade de Santos, SP. Das 300 amostras de cada espécie estudada foram preparados 60 grupos de cinco ostras e 20 grupos de 15 mexilhões. De nenhuma amostra foi detectado o parasito pela inoculação de camundongos, mas dois grupos de ostras (3,3%) foram positivos à PCR.

Pela primeira vez no Estado da Bahia e na região Nordeste do Brasil, Ribeiro (2013) pesquisou DNA específico de *T. gondii* pela *nested*-PCR para o gene SAG-1 em amostras teciduais de 624 ostras adquiridas nas cidades de Ilhéus e Camamu. Utilizando grupos de amostras de três ostras, em 17 (8,1%) houve positividade, sendo sete amostras (6,7%) em Ilhéus e dez (9,6%) em Camamu. Os autores salientam a indicação de contaminação da água dos estuários estudados e o risco no consumo de bivalves contaminados.

Zhang et al (2014) percebem como uma ameaça à saúde o consumo de moluscos bivalves crus uma vez que já foram detectados oocistos de *Toxoplasma* em bivalves comestíveis e não comestíveis.

### ***Cryptosporidium* spp**

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

Em 1912, Ernest Edward Tyzzer publicou o achado de uma nova espécie, o *Cryptosporidium parvum* TYZZER, 1912. Durante aproximadamente as sete décadas que se seguiram a essa descoberta, o protozoário, assim como a enfermidade provocada por ele, foram negligenciados e ignorados pela comunidade científica, até os primeiros encontros da parasitose no ser humano, sendo até aquele momento, considerada uma doença de baixa importância econômica e de pouca importância médica (FAYER et al, 1997). No entanto, a patogenicidade em humanos, foi demonstrada com a descrição de dois casos de criptosporidiose em 1976 e ocorrência na década de 80 de infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos, principalmente a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Fayer, 2004)

Assim, um grande número de estudos e publicações sobre a criptosporidiose vem sendo desenvolvido, principalmente sobre os aspectos biológicos do protozoário, caracterização genotípica, modos de transmissão, principais grupos e fatores de risco para a saúde pública, o tratamento da parasitose, com ênfase especial no desenvolvimento de métodos de recuperação e detecção em amostras hídricas e alimentares (ROSE, 1997; SMITH, ROSE, 1998; GRIFFITHS, 1998; FAYER et al, 2000; 2004; DAWSON, 2005; COULLIETTE, 2006; SMITH et al, 2007; ROBERTSON, GJERDE, 2007).

O *Cryptosporidium* é o único protozoário parasito intracelular que apresenta localização extra-citoplasmática, pois parasita a superfície das microvilosidades dos enterócitos intestinais (FAYER et al, 2000; SODRÉ, FRANCO, 2001). A forma infectante, encontrado fora do hospedeiro é o oocisto, seu tamanho varia de 3,0 a 8,5µm, tendo formato ovalado a esférico, apresentando uma parede de dupla membrana, o que lhe confere resistência contra o estresse ambiental a fatores limitantes à sua presença e persistência no ambiente (FAYER et al, 1997; SUNNOTEL et al, 2006). A parede do oocisto de

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

Apresenta ciclo biológico monoxênico e inclui um processo de multiplicação assexuada (merogonia) com ocorrência de duas gerações de merontes e outro de multiplicação sexuada (gametogonia) com formação de macrogametas e microgametas que, após a fecundação, resultam na formação de oocistos. Dois tipos de oocistos são formados: um de parede espessa, que é excretado para o meio externo com as fezes, e um de parede delgada, que se rompe no intestino delgado e, acredita-se, é responsável pelos casos de auto-infecção. Os oocistos esporulam no interior do hospedeiro e já são infectantes quando eliminados para o meio ambiente. A duração do ciclo biológico é curta e, segundo estudos realizados em várias espécies de animais, varia, em média de dois a sete dias (NEVES, 2005).

Segundo Monis e Thompson (2003), oocistos de parede delgada, correspondem a 20% do total de oocistos que são responsáveis pela manutenção do ciclo biológico e aumento da carga parasitária dentro do hospedeiro e, portanto, podem invadir outras células pelo mecanismo de auto-infecção interna, e aqueles de parede grossa equivalen a 80% do total, são eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados para a perpetuação da espécie.

A criptosporidiose afeta indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos. Em imunocompetentes a parasitose tem uma duração auto-limitada, sendo caracterizada pelo aparecimento de manifestações clínicas como diarréia, podendo ser acompanhada de dores abdominais, perda de apetite, febre baixa, náusea, vômitos, perda de peso, vertigens, mialgias, dores nas articulações e, infecções assintomáticas são relativamente freqüentes (FAYER et al, 2000; HELLARD et al, 2000). Esta infecção pode afetar também com severidade outros grupos populacionais como crianças entre zero a cinco anos (especialmente àquelas que freqüentam creches), idosos, desnutridos, diabéticos, além de indivíduos portadores da AIDS (FAYER et al, 2000; CACCIÒ et al, 2005; FARTHING, 2006).

Tais grupos populacionais podem ser gravemente afetados por diversas espécies de *Cryptosporidium* que apresentam potencial infectante para o ser humano. Embora a classificação e diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* já tenha sido um ponto bastante controverso, com o surgimento das ferramentas moleculares tem sido possível elucidar e classificar as espécies, levando em consideração os aspectos moleculares, a biologia, especificidade de hospedeiros e o tamanho dos oocistos (CACCIÒ et al, 2005; SUNNOTEL et al, 2006).

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

### ***Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909, pertence ao filo Apicomplexa, que agrupa parasitos intracelulares obrigatórios, os quais apresentam uma estrutura chamada complexo apical (TENTER et al, 1992). Classificado, na Ordem Eucoccidiorida, sub-classe Coccidiasina e Família Sarcocystidae (Levine 1988) tem como parentes próximos os parasitos dos gêneros *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Hammondia* e *Neospora*, cujo ciclo de vida é alternado entre um hospedeiro intermediário, definido como o hospedeiro dos estágios assexuados, e um hospedeiro definitivo, que alberga os estágios sexuados. No hospedeiro intermediário, ocorre um ou mais ciclos proliferativos em vários tecidos, culminando na formação de cistos teciduais. No hospedeiro definitivo, a fase sexual leva à formação de oocistos no intestino (TENTER, JOHNSON, 1997). É um protozoário patogênico ubíquo, prevalente na maioria das regiões do mundo (FERREIRA et al, 2013; BLACK, BOOTHROYD, 2013).

*T. gondii* possui ciclo de vida heteróxico facultativo, um dos mais polixenicos conhecidos atualmente, apresentando como hospedeiros intermediários animais homeotérmicos, e como definitivos indivíduos da família Felidae (TENTER et al, 2000;

ARKUSH et al, 2013; FERREIRA et al, 2013). Durante o complexo ciclo de vida, duas fases de desenvolvimento ocorrem nos hospedeiros intermediários, na primeira os taquizoítos multiplicam rapidamente por endodiogonia em diferentes tipos de células hospedeiras, ao acumularem cerca de 64 a 128 parasitos por células saem e infectam células vizinhas (BLACK, BOOTHROYD, 2000). Na segunda fase, o desenvolvimento de taquizoítos resulta na formação de cistos teciduais, dentro destes, bradizoítos multiplicam vagarosamente por endodiogonia, esses cistos são encontrados predominantemente no sistema nervoso central e em tecidos musculares, e em alguns hospedeiros permanecem durante toda a vida. Quando ingeridos por hospedeiros definitivos, os bradizoítos iniciam uma fase assexuada de proliferação nas células epiteliais do intestino delgado, o estágio terminal dessa fase assexuada dá início a fase sexuada, através da gamogonia e formação de oocistos ainda no epitélio do intestino delgado. Oocistos não esporulados são liberados no lúmen do intestino delgado de onde serão liberados para o ambiente juntamente com as fezes. A esporogonia ocorre fora do hospedeiro e permite o desenvolvimento de oocistos infecciosos (TENTER et al, 2000).

As três formas infectantes envolvidas no ciclo de vida:

1) taquizoítos, que ocorrem na infecção aguda, apresentando forma curvada, com cerca de  $2 \times 6 \mu\text{m}$ , extremidade anterior afilada e a posterior arredondada. O núcleo é bem definido, geralmente situado na extremidade posterior ou no centro da célula (DUBEY, 1979). Comparados aos bradizoítos, resistentes à digestão ácida, os taquizoítos são facilmente destruídos quando expostos à solução ácida de pepsina por 30 minutos, apesar de alguns parasitos extracelulares poderem sobreviver em pepsina ácida por duas horas em ensaios *in vitro* (DUBEY, 1998).

2) bradizoítos, causadores da infecção latente ou crônica, diferem muito pouco dos taquizoítos, sendo ricos em grânulos de glicogênio, encontrados dentro de cistos teciduais, que podem atingir de  $5 \mu\text{m}$  a  $100 \mu\text{m}$  de diâmetro, com formato sub-esférico ou de acordo com a morfologia da célula parasitada. A parede cística é elástica e argirófila, contendo centenas ou milhares de bradizoítos. São mais encontrados nos tecidos nervoso e muscular, incluindo o cérebro, olho, músculos esqueléticos e cardíaco (DUBEY, 1979). Os

cistos teciduais são bastante sensíveis às condições ambientais, sendo destruídos pela cocção a 67°C, pelo congelamento a -12°C por 24 horas, e pela radiação gama em doses de 0,5 kGy; a cocção por microondas não afeta os cistos de *T.gondii* (DUBEY, 1996).

3) esporozoítos, em oocistos, forma resultante do ciclo enteroepitelial do parasito, que só ocorre nos felídeos. Quando não esporulados, os oocistos apresentam formas variáveis de sub-esférica a esférica, com diâmetro de 10x12 µm, com duas membranas incolores. Esporulados, são sub-esféricos ou elipsoidais, medindo 11x13 µm, contendo dois esporocistos elipsoidais de 6x8 µm, com quatro esporozoítos de 2x6-8 µm em cada um (DUBEY, 1979). Os oocistos não esporulados não sobrevivem ao congelamento, mas podem continuar viáveis por meses se mantidos a 4°C, sendo destruídos se submetidos a temperaturas de 37°C por 24 horas ou de 50°C por 10 minutos. Quando esporulam, os oocistos tornam-se mais resistentes frente às condições ambientais e agentes químicos, podendo sobreviver durante anos se mantidos a 4°C em meio líquido (LINDSAY et al, 1997).

*T. gondii* possui importância médica e veterinária devido a sua capacidade de provocar abortos ou doença congênita em seus hospedeiros, causando perdas econômicas significativas à pecuária, principalmente quando se refere aos ovinos (TENTER, 1999), é capaz de infectar e replicar dentro de praticamente qualquer célula nucleada de seus hospedeiros (DUBEY 1998; WONG, REMINGTON, 1993) e é na atualidade um dos coccídeos mais estudados (TENTER et al, 2000).

O homem e os animais podem infectar-se pelas três formas do ciclo de vida do agente: (1) via oral pela ingestão de oocistos eliminados nas fezes de felídeos e infectantes após esporulação em um a cinco dias, (2) pela ingestão de cistos em tecidos de hospedeiros intermediários, e (3) via uterina pela transmissão transplacentária de taquizoítos. O *T.gondii* também pode ser transmitido em produtos sangüíneos, transplantes de órgãos, ou pela ingestão de taquizoítos, em leite caprino não pasteurizado (TENTER, 1999).

A ingestão de oocistos, independente da dose, resulta em infecções mais severas do que aquelas provocadas pela ingestão de cistos teciduais em humanos (JONES, DUBEY, 2010). Segundo Dubey (1996), a ingestão de apenas um oocisto pode provocar

infecção em animais como porco e camundongos, (e presumivelmente em humanos), mas no caso dos hospedeiros definitivos a ingestão de 100 oocistos pode não ser uma dose infectante para o mesmo. Entretanto, gatos são capazes de disseminar através de suas fezes milhões de oocistos após ingerir um bradizoíto somente, enquanto a ingestão de 100 bradizoítos pode não infectar um camundongo (DUBEY, 2001; DUBEY et al, 2006).

Em muitas partes do mundo a população de gatos como animais de estimação tem aumentado nos últimos anos, no entanto a infecção pode não estar relacionada ao contato direto com esses animais, mas sim com suas fezes e o destino das mesmas. No caso dos humanos, é necessário um maior cuidado ao lidar com as terras onde os gatos domésticos costumam enterrar suas fezes, pois caso estejam contaminadas com oocistos é sinal de perigo à saúde (TORREY, YOLKEN, 2013) uma vez que a quantidade de oocistos que apenas um gato pode liberar com as fezes varia de 3 a 810 milhões (DABRITZ, CONRAD, 2010).

A toxoplasmose é uma das zoonoses parasitárias mais comuns (TENTER, 1999) capaz de acometer hospedeiros a nível mundial, o que faz dela um exemplo raro de doença parasitária que causa impacto também na saúde pública de países desenvolvidos (TORGERSON, 2013). A toxoplasmose congênita que envolve níveis variados de alterações neurológicas e cegueira, resulta em aproximadamente 2300 DALYs (anos de vida perdidos por incapacidade) por ano apenas na Holanda, onde esta é a principal doença infecciosa de origem alimentar (WHO, 2011).

Esta zoonose geralmente se apresenta assintomática em indivíduos imunocompetentes (BAHIA-OLIVEIRA et al, 2003; TORREY, YOLKEN, 2013). Entretanto, indivíduos sem sintomas podem desenvolver complicações em caso de baixa imunidade (FERREIRA et al, 2013).

Condições clínicas severas podem ocorrer em crianças infectadas no útero e em indivíduos imunocomprometidos (FRENKEL et al, 1970). A infecção de gestantes, previamente soronegativas, pode causar síndrome congênita gerando surdez, convulsões, distúrbios na retina e alterações neurológicas no feto ou recém nascido (TORREY, YOLKEN, 2013; TORGERSON, 2013).

Alguns estudos tem sugerido que infecção por *T.gondii* pode causar sérios efeitos neurológicos pós-natais (FLEGR et al, 2000) e que existe uma associação entre a prevalência deste patógeno e a esquizofrenia (TORREY, YOLKEN, 2007). Embora poucos estudos tenham analisado a relação do comportamento humano com esta infecção, indivíduos infectados tem demonstrado desenvolvimento psicomotor anormal, baixo peso e facilidade de se envolver em acidentes de trânsito, além de apresentar reações mais lentas a estímulos e capacidade diminuída em manter a concentração (WEBSTER et al, 2006).

Nos Estados Unidos da América, pela análise dos dados de nove sistemas nacionais de notificação em saúde e dados publicados em periódicos especializados, estimam-se 1.500.000 infecções anuais, sendo cerca de 15% sintomáticas. Neste país, entre 1992 e 1996, a toxoplasmose foi a responsável por cerca de 5.000 hospitalizações, com pelo menos 2.500 casos de origem alimentar, o que representa 4,1% das internações causadas por infecções alimentares. No período foram registrados 750 óbitos por toxoplasmose, com cerca de 50% de infecções adquiridas pelo consumo de alimentos contaminados, o que representa 20,7% das mortes associadas à infecções de origem alimentar. Além disso, o desenvolvimento de casos crônicos de toxoplasmose, como naqueles indivíduos infectados pela via congênita, nos que desenvolvem coriorretinite e em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), é estimado em 4.700 a 12.100 casos anuais (Mead et al, 1999). Estimativas mais recentes indicam que os custos de hospitalizações devido à toxoplasmose nos EUA seriam da ordem de US\$ 397,000,000.00 anuais, já se considerando que uma parte destas infecções se dá pela ingestão de água ou organismos aquáticos contaminados (COLLIER et al, 2012).

Smith (1997) estima que 1/50 da população norte-americana sofre de algum grau de imunodeficiência, o que pode contribuir para uma maior susceptibilidade a doenças oportunistas. Nesta população incluem-se mulheres grávidas, pessoas com mais de 65 anos de idade, pacientes sob tratamento para câncer, transplantados e portadores do HIV. O estado imunodeficiente destes indivíduos pode colocá-los em risco de agravar a toxoplasmose ou de reativação de infecções crônicas.

A manutenção do *Toxoplasma* nos ecossistemas resulta da contaminação ambiental com oocistos de hospedeiros definitivos selvagens e domésticos (THOMPSON, 2013). Para Sroka et al (2010), os oocistos que são disseminados pelos felídeos contaminam o ambiente terrestre mas podem ser conduzidos e contaminar águas superficiais e subterrâneas. Além disso, o autor afirma que o problema epidemiológico da toxoplasmose pode ser acentuado em áreas rurais onde existem muitas rotas de transmissão cruzada do *T.gondii*.

A partir da década de 1990 diversos surtos de transmissão hídrica de *T. gondii* foram documentados, o que agregou esta via de transmissão às múltiplas formas de disseminação deste parasito na natureza (KARANIS et al, 2013). Desta forma, além das já tradicionais vias de infecção, a ingestão de água contaminada com oocistos ganhou grande importância, devido à detecção do parasito em diversas espécies aquáticas (JONES, DUBEY, 2010), inclusive em moluscos bivalves (ESMERINI et al, 2010; RIBEIRO, 2013).

Invertebrados marinhos filtradores, como mexilhões e ostras, parecem não se infectar, mas podem concentrar oocistos viáveis de *T.gondii* (ARKUSH et al, 2003; LINDSAY et al, 2004) devido a capacidade dos oocistos de *T.gondii* ser capaz de esporular em ambiente marinho e permanecer infectante por cerca de seis meses (LINDSAY et al, 2003).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Detectar contaminação natural de ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* cultivadas em áreas de influência da baía de Todos os Santos por protozoários Apicomplexa.

### **Objetivos Específicos**

Detectar o DNA de protozoários Apicomplexa em amostras teciduais de *Crassostrea rhizophorae*;

Pesquisar a associação entre a origem e a presença dos protozoários nas ostras;

Verificar associações entre dados biométricos e presença dos protozoários nas ostras.

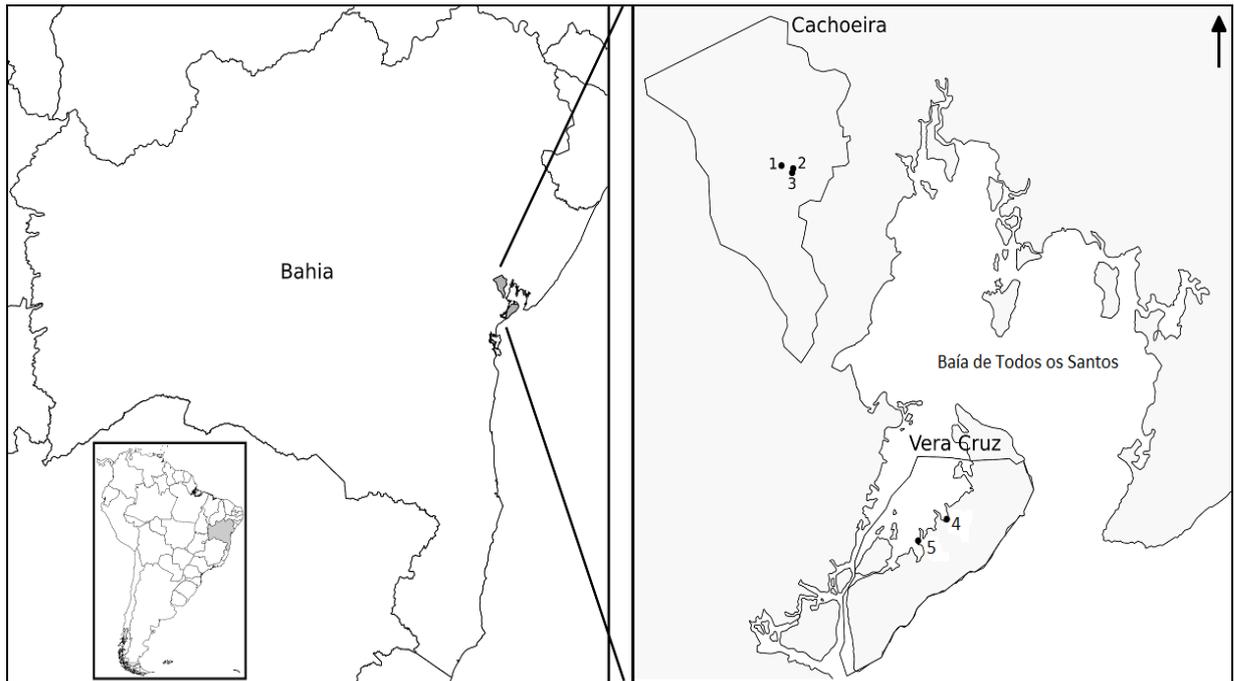
## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de Estudo

O presente estudo foi realizado em áreas do ecossistema de manguezal dos municípios de Cachoeira (12° 37' S, 38° 57' O) e Vera Cruz (12° 57' S e 38° 36' O) - Figura 1, os quais possuem cultivos de ostras e contam com o apoio da Bahia Pesca – órgão estadual ligado à Secretaria Estadual de Agricultura, responsável por desenvolver ações voltadas ao desenvolvimento da aqüicultura. Estes municípios estão situados na área de influência da Baía de Todos os Santos (BTS), segunda maior baía do Brasil, onde se localiza a terceira maior cidade brasileira, Salvador, capital do Estado da Bahia. A BTS apresenta uma área de 1.233 Km<sup>2</sup> com expressiva extensão de recifes de corais, estuários e manguezais (HATJE, ANDRADE, 2009).

Os locais de coleta foram escolhidos por possuírem cultivo de ostras, que tem os habitantes da comunidade local como os responsáveis pela comercialização das mesmas como alternativa de fonte de renda, e para isso organizam-se em associações e/ou cooperativas, sendo também utilizados na própria alimentação. Nestas comunidades, as residências não possuem sistema de esgotamento sanitário, e muitas vezes o quintal das casas é extensão do próprio ambiente de manguezal. Além disso, a comunidade costuma ter animais domésticos (de companhia e de pecuária) que transitam livremente. Em um dos pontos de coleta, existem muitas fazendas que têm o escoamento dos dejetos domésticos e dos animais em locais próximos aos cultivos de ostras.

Figura 1. Localização dos pontos de coleta de *Crassostrea rhizophorae*. Feira de Santana, BA. 2013. Pontos de coleta nos município de Cachoeira (1,2, 3) e de Vera Cruz (4, 5).



### Coleta dos espécimes

Os animais foram coletados durante o período de janeiro a abril de 2013, em dois pontos de cultivo (Figura 2 e Figura 3) do município de Vera Cruz – VC1: Baiacu (S: 12°59'12,3"; O: 38°41'44,1") e VC2: Ponta Grossa (S: 13°00'26,3"; O: 38°43'31,3"), e em três pontos de cultivo (Figura 4) do município de Cachoeira – CH1: Calemba (S: 12°39'12,7"; O: 38°51'16,5"), CH2: Dendê (S: 12°39'27,9"; O: 38°51'20,7") e CH3: Engenho da Ponte (S: 12°39'02,7"; O: 38°52'00,0"). Após a coleta, os exemplares foram acondicionados em caixas plásticas contendo água do mar e transportados em caixas isotérmicas, ao Laboratório do Grupo de Zoonoses e Saúde Pública da Universidade Estadual de Feira de Santana. Em uma planilha de campo foram anotadas as coordenadas geográficas e os horários de coleta. Os valores referentes à temperatura, umidade e precipitação foram obtidos junto à base de dados do Instituto Nacional de Meteorologia (BRASIL, 2013).

Figura 2. Área de manguezal no município de Vera Cruz. Seta à esquerda indica a área de cultivo de *Crassostrea rhizophorae*. Feira de Santana, BA. 2013.



Figura 3. Área de cultivo de *Crassostrea rhizophorae* em ponto de coleta do município de Vera Cruz. Feira de Santana, BA. 2013.



Figura 4. Área de manguezal no município de Cachoeira. Feira de Santana, BA. 2013.

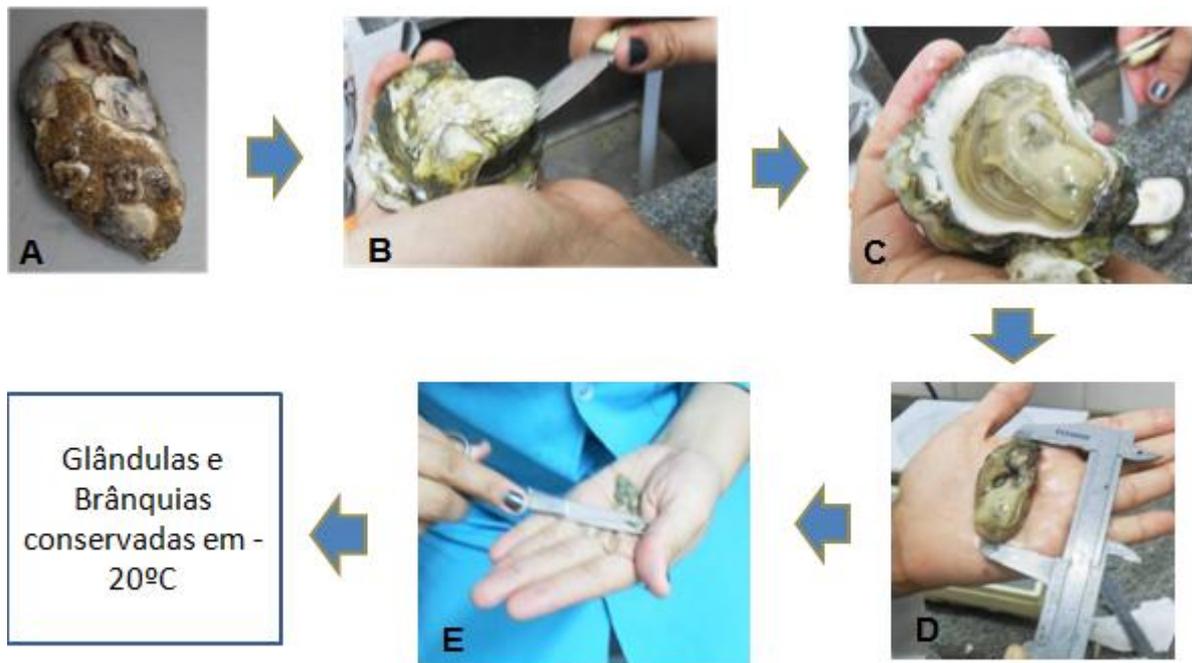


### Preparo das amostras

No laboratório, as superfícies exteriores das conchas das ostras foram lavadas com água corrente. Em seguida os animais foram mensurados quanto ao eixo dorso-ventral (altura) e comprimento usando um paquímetro manual e a massa total determinada em balança digital com 0,01 g de precisão.

Grupos de três animais foram separados baseados em características biométricas semelhantes e enumerados. As valvas foram abertas com o auxílio de uma faca, e uma vez desconchadas, as ostras foram mensuradas em seu comprimento com auxílio de paquímetro e tiveram sua massa determinada em balança digital de precisão 0,001g. A seguir, com auxílio de tesoura, as brânquias e porções da glândula digestiva foram removidas, tiveram sua massa mensurada e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , separadamente, em microtubos de 1,5 mL, devidamente identificados (Figura 5).

Figura 5. Processamento de ostras *Crassostrea rhizophorae* para obtenção de amostras teciduais. Feira de Santana, BA. 2013.



Etapas de processamento das ostras em laboratório: Figuras A: após lavagem; B: abertura; C: após aberta; D: mensuração sem valvas; E: excisão de tecidos

Para maceração das amostras, as mesmas foram descongeladas e os tecidos (brânquias e glândulas digestivas separadamente) dos grupos de animais foram macerados em cadinho com pistilo. Desta forma, cada amostra consistiu de brânquias ou de glândulas de três animais. Em seguida, alíquotas de aproximadamente 0,5 mL foram colocadas em microtubos plásticos estéreis com capacidade de 2 mL e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração de DNA.

### Extração e precipitação de DNA

Para extração e precipitação do DNA das amostras teciduais utilizou-se o kit *Easy DNA (Invitrogen®)* conforme instrução do fabricante, com algumas alterações, como seguem.

Às alíquotas de 0,5 mL de tecidos foram adicionadas esferas de vidros (*Glass beads, acid-washed 425-600  $\mu\text{m}$  – Sigma®*) com o auxílio de uma espátula de colher pequena. A seguir acrescentou-se 400  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-EDTA pH 8,0 (TE), homogeneizou-se por um minuto, em vortex, e centrifugou-se por dez minutos a 20.000 g a  $25^{\circ}\text{C}$ . A seguir o sobrenadante foi transferido para outro microtubo devidamente identificado e estéril, e uma nova lavagem nas amostras pela adição de 150  $\mu\text{L}$  de TE, homogeneizado por um

minuto, centrifugado por dez minutos a 20.000 g a 25°C. O sobrenadante foi adicionado ao microtubo com o sobrenadante do passo anterior e os microtubos que continham o sedimento foram desprezados. Ao microtubo com o sobrenadante foi adicionado 350 µL da solução A do kit e homogeneizado durante um minuto. Em seguida as amostras foram submetidas à choque térmico pelo congelamento em nitrogênio líquido por 15 segundos e em seguida levadas ao banho seco de dois a três minutos a uma temperatura de 96°C; este procedimento foi repetido cinco vezes. A seguir acrescentou-se 5 µL de proteinase K às amostras que então foram submetidas a incubação a 60°C em banho seco durante 60 minutos. A seguir foi adicionado 150 µL da solução B e homogeneizadas, com o auxílio do vortex, por um minuto, em seguida foi adicionado 500µL de clorofórmio e homogeneizada por um minuto, seguida por uma centrifugação de 20 minutos a 20.000 g a 4°C. Ao final da centrifugação o sobrenadante de cada amostra foi transferido para outro microtubo devidamente identificado e estéril.

A cada microtubo foi adicionado 1000 µL de etanol absoluto a -20°C, homogeneizadas e em seguida incubou-se na geladeira (4°) por 30 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos, a 20.000 g a 4°C, em seguida o etanol foi removido. Adicionou-se 500µL de etanol 80% a -20°C e homogeneizou-se por inversão dos tubos por cinco vezes, seguido de centrifugação por cinco minutos a 20.000 g a 4°C. A seguir o etanol foi removido e centrifugou-se por mais três minutos a 20.000 g a 4°C e em seguida removeu-se o resíduo de etanol e deixou secar a temperatura ambiente durante cinco minutos. A cada microtubo foi adicionado 100 µL de TE e dois microlitros de RNase e incubados em banho-seco a 37°C durante 30 minutos.

A concentração de DNA das amostras foi determinada no equipamento Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*®) e ajustada com TE para aproximadamente 200 ng/µl. A seguir as amostras foram armazenadas a -20° C até a realização da reação em cadeia pela polimerase.

## Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção de Apicomplexa

### Pesquisa de DNA de *Cryptosporidium* spp

A pesquisa de DNA de *Cryptosporidium* spp foi realizada segundo descrito por Silva et al (2013). As amostras de DNA foram submetidas a *nested*-PCR. Na primeira reação foram utilizados os oligonucleotídeos SHP1 (5'ACC TAT CAG CTT TAG ACG GTA GGG TAT 3') e SHP2 (5'TTC TCA TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG 3'), e para a segunda reação, os oligonucleotídeos SHP3 (5'ACA GGG AGG TAG TGA CAA GAA ATA ACA 3') e SSU-R3 (5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3'). A primeira amplificação utilizou 25 µL de solução contendo 3,0 µL de amostra de DNA, 12,5 µL de *TopTaq Master Mix (Qiagen®)*, 7,5 µL de água ultrapura e 10 pmol de cada oligonucleotídeo. As reações foram realizadas no termociclador *EP gradient (Eppendorf®)*, sob as seguintes condições: denaturação inicial a 94°C por três minutos, seguidos de 39 ciclos de 94°C por 45 segundos, 56°C por 45 segundos e 72°C por 60 segundos, com extensão final a 72°C por sete minutos. Na segunda amplificação foram utilizadas as mesmas condições, substituindo-se os oligonucleotídeos pelo par apropriado e usando 3,0 µL do produto da primeira amplificação. Em cada lote de amplificação foi adicionado um controle positivo constituído por DNA extraído de *Cryptosporidium canis* oriundo de fezes de cão cedidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e um controle negativo de amplificação, constituído por água ultra-pura, para cada uma das reações de PCR.

### Pesquisa de DNA de Sarcocystidae

A pesquisa de DNA de outros protozoários da família Sarcocystidae foi realizada segundo descrito por Da Silva et al (2009). As amostras de DNA foram submetidas a *nested*-PCR. Na primeira reação foram utilizados os oligonucleotídeos Tg18S48F (5'CCATGCATGTCTAAGTATAAGC3') e Tg18S359R (5'GTTACCCGTCCTGCCCAC3'), e para a segunda reação, os oligonucleotídeos Tg18S58F (5'CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC3') e Tg18S348R (5'TGCCACGGTAGTCCAATAC3'). A primeira amplificação utilizou 25,0 µL de solução contendo 3,0 µL de amostra de DNA, 12,5 µL de *TopTaq Master Mix (Qiagen®)*, 7,5

μL de água ultrapura e 10 pmol de cada oligonucleotídeo. As reações foram realizadas no termociclador *EP gradient (Eppendorf®)*, sob as seguintes condições: denaturação inicial a 95°C por quatro minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 60 segundos e 72°C por 120 segundos, com extensão final a 72°C por dois minutos. Na segunda amplificação foram utilizadas as mesmas condições, a exceção da temperatura de anelamento (60°C) e o número de ciclos (35), substituindo-se os oligonucleotídeos pelo par apropriado e usando 3,0 μL do produto da primeira amplificação. Em cada lote de amplificação foi adicionado um controle positivo constituído por DNA extraído de *Toxoplasma gondii* oriundo de lavado peritoneal de camundongos experimentalmente infectados, cedido pelo Núcleo de Pesquisa em Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, e um controle negativo de amplificação, constituído por água ultra-pura, para cada uma das reações de PCR.

#### **Eletroforese e registro dos produtos de amplificação**

Alíquotas de 5,0 μL das amostras amplificadas nas *nested*-PCRs foram homogeneizadas com 5,0 μL de azul de bromofenol e submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídeo, em cuba horizontal com solução tampão Tris–Borato-EDTA (TBE) 1 X, pH 8,0, durante 45 minutos a 120 V. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado e fotografado em sistema de fotodocumentação digital, sistema *L-Pix image* (versão 1.21) *Loccus* Biotecnologia.

#### **Análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição do DNA**

A análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição sobre os produtos amplificados pela reação em cadeia pela polimerase (PCR-RFLP) foi realizada utilizando as enzimas de restrição DdeI, Hpy188III e MspI sobre os produtos de amplificação com 290 pares de base de DNA de Sarcocytidae, a fim de se diferenciar *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* (Da Silva et al, 2009).

As digestões foram realizadas num volume total de 6 µl, contendo 3 µl do produto da *nested*-PCR misturados a 1,0 µl de tampão NEB, 1,0 µl de albumina sérica bovina (BSA) 1mg/ml, 0,4 µl de água ultra pura, 4U de Ddel, 1U de Hpy188III e 8U de Mspl. As amostras foram incubadas sob as seguintes condições: digestão 37°C por 60 minutos e inativação da enzima 65°C durante 10 minutos. Em cada lote de clivagem enzimática foram adicionados controles positivos constituídos por DNA extraído de *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* cedidos pelo Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais da Universidade Federal da Bahia.

Do produto resultante da digestão enzimática, 5,0 µl foram homogeneizados com 5,0 µl de solução de azul de bromofenol e submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose a 3%, contendo 0,3 µg de brometo de etídeo, em cuba horizontal com solução tampão Tris–Borato-EDTA (TBE) 1 X, pH 8,0, durante 55 minutos a 120V. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado e fotografado em sistema de fotodocumentação digital, sistema *L-Pix image* (versão 1.21) *Loccus* Biotecnologia.

### **Análise dos resultados**

A frequência relativa de amostras positivas entre os municípios de coleta e entre os pontos de coleta foi comparada pelo teste  $\chi^2$  de Pearson. O teste de  $\chi^2$  de McNemar foi utilizado para comparar a porcentagem de positivos dos grupos de brânquias e glândulas. A correlação entre a média das variáveis morfométricas (comprimento total, massa total, massa das brânquias e massa das glândulas digestivas) dos grupos e a frequência relativa de positivos por ponto de coleta foi verificada pelo cálculo do coeficiente de Spearman. Os cálculos foram efetuados nos programas *BioEstat 5* (AYRES et al, 2007) e *Epilnfo 7* (DEAN et al, 2011). Em todas as análises foram considerados significativos os valores de p menores que 0,05 (AYRES et al, 2007).

## RESULTADOS

### Coleta de amostras e biometria

Durante os meses de janeiro a abril de 2013 foram realizadas oito coletas, totalizando 615 ostras coletadas nos municípios de Vera Cruz e Cachoeira (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência absoluta (Fi), relativa (fi) e relativa acumulada (fia) de espécimes de *Crassostrea rhizophorae* coletados, segundo o município e ponto de coleta. Feira de Santana, 2013.

Município	Ponto de Coleta	Fi	fi	fia
Vera Cruz	VC1	124	20,16	49,43
	VC2	180	29,27	
Cachoeira	CH1	100	16,26	50,57
	CH2	106	17,24	
	CH3	105	17,07	
<b>Total</b>		<b>615</b>	<b>100,00</b>	

As estatísticas descritivas da avaliação biométrica das ostras coletadas em Vera Cruz e Cachoeira são apresentadas nas Tabelas 7 e 8 (Apêndice), respectivamente.

Do total de 615 ostras coletadas, as amostras de glândulas e brânquias foram agrupadas, sendo que os 304 espécimes coletados em Vera Cruz originaram 101 grupos amostrais de brânquias e 101 de glândulas, e daqueles 311 espécimes coletados no município de Cachoeira foram formados 104 grupos amostrais de brânquias e 104 de glândulas.

## Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção de Apicomplexa

### Pesquisa de DNA de *Cryptosporidium* spp

Em todos os 410 grupos amostrais dos tecidos das ostras, não houve detecção do DNA de *Cryptosporidium* spp, utilizando a *nested*-PCR (Figura 6).

Figura 6. Gel de eletroforese em agarose a 2% dos produtos da *nested* reação em cadeia pela polimerase para detecção de DNA de *Cryptosporidium* spp em amostras de brânquias e glândulas digestivas de *Crassostrea rhizophorae* coletadas nos municípios de Vera Cruz e Cachoeira, BA. Feira de Santana, 2013.

M) Marcador de peso molecular *TrackIt™* 100 pb *LifeTechnologies*; 1-16) Amostras de tecido de *C. rhizophorae*; 17) Controle positivo de amplificação 600 pares de base (*Cryptosporidium canis*); 18) Controle negativo (água ultra-pura) de amplificação da PCR; 19) Controle negativo (água ultra-pura) de amplificação da *nested*-PCR.



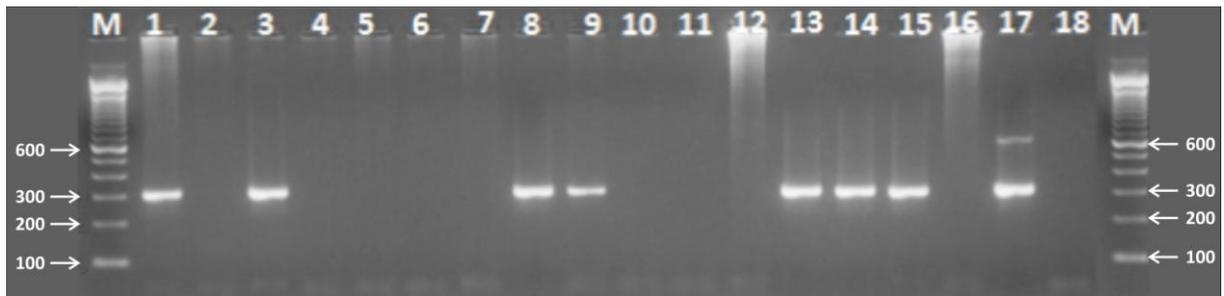
Em nenhuma amostra de tecido de ostras foi detectada a presença de DNA de *Cryptosporidium*. Em todos os lotes de amplificação os controles positivos amplificaram adequadamente.

### Pesquisa de DNA de Sarcocystidae

Em um total de 410 amostras teciduais de ostras *Crassostrea rhizophorae* analisadas para a presença do DNA de outros Apicomplexa observou-se em 43 (10,4%) amostras a amplificação de uma banda de 290 pares de base e em 12 (2,9) amostras a amplificação de uma banda de 310 pares de base (Figura 7). Apenas as amostras que apresentaram banda de 290 pares de base foram submetidas à restrição enzimática.

Figura 7. Gel de eletroforese em agarose a 2% dos produtos da reação em cadeia pela polimerase para detecção de DNA de Sarcocystidae em amostras de brânquias e glândulas digestivas de *Crassostrea rhizophorae* coletadas nos municípios de Vera Cruz e Cachoeira, BA. Feira de Santana, 2013.

M) Marcador de peso molecular *TrackIt™* 100 pb *LifeTechnologies*; 1,3,8 e 9) Amostras de tecido de *C. rhizophorae* com bandas de 310 pares de base; 13-15) Amostras de tecido de *C. rhizophorae* com bandas de 290 pares de base 17) Controle positivo de amplificação (*Toxoplasma gondii* cepa RH) com banda de 290 pares de base ; 18) Controle negativo (água ultra-pura) da *nested-PCR*; M) Marcador de peso molecular *TrackIt™* 100 pb *LifeTechnologies*.

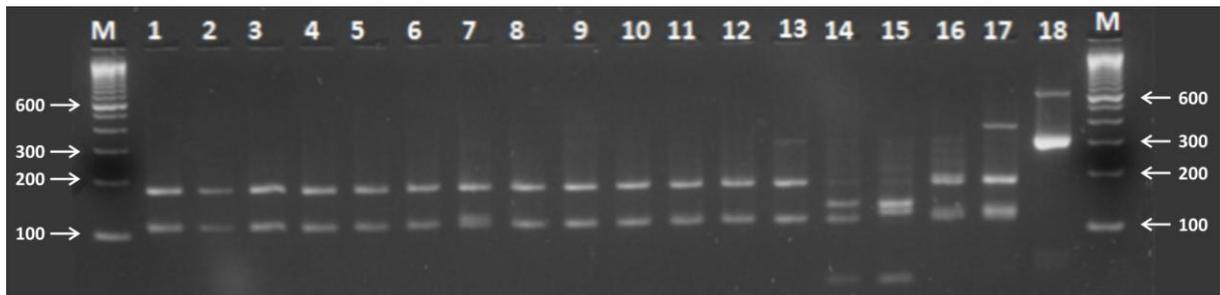


### Análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição do DNA

Na figura 8, pode-se visualizar o produto final dos amplicons resultantes da *nested-PCR* que foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição DdeI, Hpy188III e MspI. Das 43 amostras examinadas, 11 (25,5%) não foram clivadas pelas enzimas, enquanto 32 (74,5%) apresentaram clivagem compatível a do controle positivo para *T. gondii*.

Figura 8. Gel de eletroforese em agarose a 3% dos produtos da PCR-RFLP para detecção de DNA de Sarcocystidae em amostras de brânquias e glândulas digestivas de *Crassostrea rhizophorae* coletadas nos municípios de Vera Cruz e Cachoeira, BA. Feira de Santana, 2013.

M) Marcador de peso molecular *TrackIt™* 100 pb *LifeTechnologies*; 1-13) Amostras clivadas pelas enzimas; 14) Controle positivo de *Hammondia hammondi* clivado pelas enzimas; 15) Controle positivo de *Neospora caninum* clivado pelas enzimas; 16) Controle positivo de *Sarcocystis neurona* clivado pelas enzimas; 17) Controle positivo de *Toxoplasma gondii* clivado pelas enzimas; 18) Controle positivo de amplificação (*Toxoplasma gondii* cepa RH) com banda de 290 pares de base; M) Marcador de peso molecular *TrackIt™* 100 pb *LifeTechnologies*.



Das 32 amostras que apresentaram clivagem enzimática, 20 (9,6%) são oriundas do município de Cachoeira, enquanto 12 (5,9%) são de origem do município de Vera Cruz. Essa diferença não foi significativa (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência absoluta (N) e relativa (%) dos resultados da reação em cadeia pela polimerase para a detecção de DNA compatível com *Toxoplasma gondii* em grupos de tecidos de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em dois municípios banhados pela Baía de Todos os Santos, BA. Feira de Santana, 2013.

Município	Detecção de DNA compatível com <i>Toxoplasma gondii</i>				Total	
	Positivo		Negativo		N	%
	N	%	N	%		
Cachoeira	20	9,6	188	90,4	208	62,50
Vera Cruz	12	5,9	190	94,1	202	37,50
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>7,8</b>	<b>378</b>	<b>92,2</b>	<b>410</b>	<b>100,00</b>

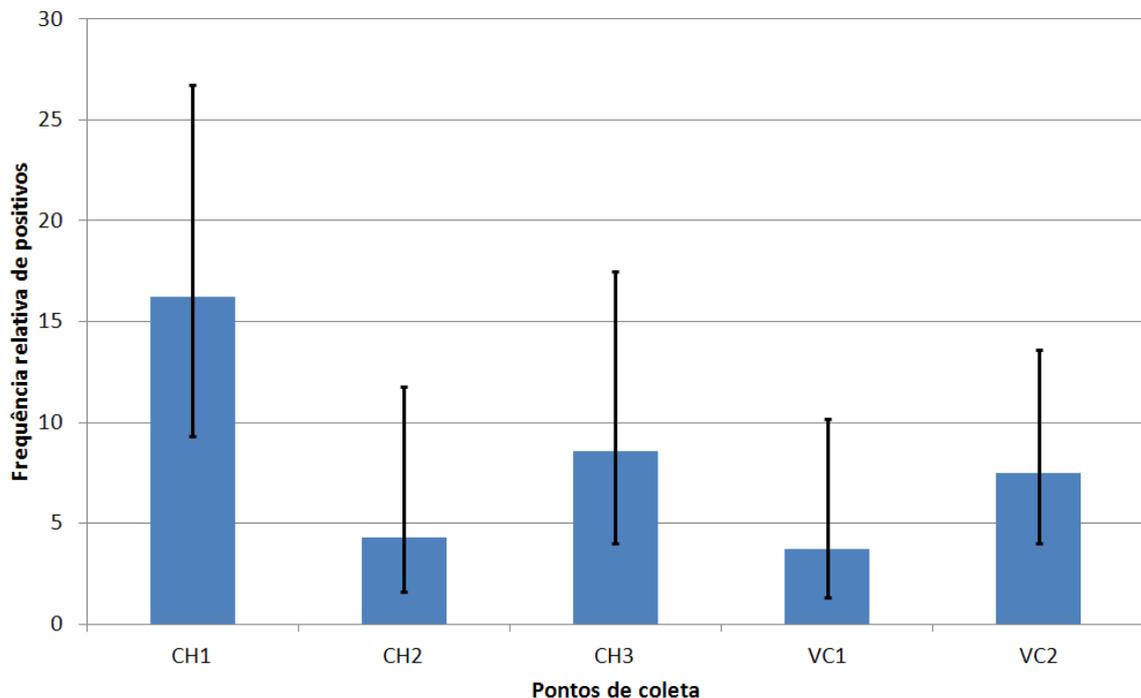
Na tabela 3 e figura 9 é possível observar o número de positivos por ponto de coleta, e embora os cinco pontos de coleta das ostras para a realização deste trabalho, apresentem características semelhantes, foi observada uma diferença significativa no número de positivos do ponto CH1, quando comparado aos outros.

Tabela 3. Frequência absoluta (N), frequência relativa (%) e intervalo de confiança 95% (IC95% positivos) dos resultados da reação em cadeia pela polimerase para a detecção de DNA de *Apicomplexa* em grupos de tecidos de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em dois municípios banhados pela Baía de Todos os Santos, BA, segundo os pontos de coleta. Feira de Santana, 2013.

Ponto de coleta	Detecção de DNA compatível com <i>Toxoplasma gondii</i>							IC95% da % de positivos
	Positivo		Negativo		TOTAL			
	N	%	N	%	N	%		
CH1	11	16,2 <sup>b</sup>	57	83,8	68	16,59	9,3 – 26,7	
CH2	3	4,3 <sup>a</sup>	67	95,7	70	17,07	1,6 – 11,8	
CH3	6	8,6 <sup>ba</sup>	64	91,4	70	17,07	4,0 – 17,5	
VC1	3	3,7 <sup>a</sup>	79	96,3	82	20,00	1,3 – 10,2	
VC2	9	7,5 <sup>a</sup>	111	92,5	120	29,27	4,0 – 13,6	
<b>TOTAL</b>	<b>32</b>	<b>7,8</b>	<b>378</b>	<b>92,2</b>	<b>410</b>	<b>100,00</b>		

Obs.: frequências relativas de positivos seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os pontos de coleta pelo teste de Qui-quadrado.

Figura 9. Frequência relativa e intervalo de confiança 95% de positivos a reação em cadeia pela polimerase para a detecção de DNA compatível com *Toxoplasma gondii* em grupos de tecidos de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em dois municípios banhados pela Baía de Todos os Santos, BA, segundo os pontos de coleta. Feira de Santana, 2013.



Ao comparar a massa das glândulas ou a massa fresca total das ostras, com a porcentagem de positivos (Tabela 4), verifica-se haver uma tendência de aumento da

frequência de positivos de acordo com o aumento da massa. Entretanto, não houve correlação significativa entre os pares de variáveis (Tabela 5).

Tabela 4. Média do comprimento total (Ct) em cm, média da massa total (Mt), da massa da glândula digestiva e da massa da brânquia em g, porcentagem de brânquias (PB) e glândulas (PG) positivas para a presença de DNA compatível com *Toxoplasma gondii* em grupos de ostras *Crassostrea rhizophorae*, segundo o Município e pontos de coleta de amostras. Feira de Santana, 2013.

Município	Ponto de Coleta	Ct	Mt	Mb	Mg	PB	PG	Número de grupos
Vera Cruz	VC1	2,97	1,46	0,24	0,23	9,75	12,19	41
	VC2	3,78	2,65	0,44	0,40	1,67	3,33	60
Cachoeira	CH1	5,96	8,39	0,86	1,20	8,58	22,86	35
	CH2	5,93	7,61	0,85	1,16	0,00	8,82	34
	CH3	5,37	7,08	0,71	0,97	8,57	8,57	35

Tabela 5. Análise de correlação entre variáveis morfométricas (Ct - comprimento total, Mt – massa total, Mb – massa das brânquias, Mg – massa das glândulas digestivas) e a frequência relativa de positivos para a detecção de DNA compatível com *Toxoplasma gondii* em grupos de glândulas digestivas (PG) e brânquias (PB) de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em dois municípios banhados pela Baía de Todos os Santos, BA. Feira de Santana, 2013.

Pares de variáveis	R	Valor de P
Ct x PPB	-0,19	0,377
Ct x PPG	0,39	0,255
Mt x PPB	-0,07	0,455
Mt x PPG	0,47	0,213
Mg x PPG	0,39	0,260
Mb x PPB	-0,14	0,413

Quando comparados os tecidos quanto à positividade para DNA compatível com *Toxoplasma gondii*, o teste de McNemar não demonstrou associação com o tipo de tecido avaliado (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação entre os resultados da detecção de DNA de compatível com *Toxoplasma gondii* em grupos de tecidos de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em dois municípios banhados pela Baía de Todos os Santos, BA, segundo os órgãos avaliados. Feira de Santana, 2013.

	Glândulas digestivas				Total		
	Positivos		Negativo		N	%	
	N	%	N	%			
<b>Brânquias</b>	Positivos	4	1,95	9	4,39	13	6,34
	Negativos	17	8,29	175	85,37	192	93,66
	<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>10,24</b>	<b>184</b>	<b>89,76</b>	<b>205</b>	<b>100,00</b>

## DISCUSSÃO

Moluscos bivalves, como as ostras, são comestíveis e costumam ser consumidos cozidos e crus, e é esta última forma de consumo que faz deste bivalve uma potencial fonte de infecção, principalmente para os humanos, uma vez que, organismos patogênicos podem ficar retidos na carne dos moluscos através do processo de filtração da água do mar, e ao serem consumidos podem transmitir diferentes agentes capazes de provocar enfermidades. Invertebrados marinhos estuarinos como moluscos bivalves atuam como filtro biológico eficiente para microorganismos patogênicos (LINDSAY et al, 2001; ARKUSH et al, 2003; FAYER et al, 2004).

Neste sentido, oocistos de protozoários patogênicos como, *Cryptosporidium* spp e *Toxoplasma gondii*, tem alcançado o ambiente marinho tanto por lixiviação do solo como por emissão de esgotos tratados e não tratados o que pode representar um alerta para a saúde de humanos e de animais.

No presente estudo não foi verificada presença de DNA de *Cryptosporidium* spp nas 410 amostras teciduais de ostras *Crassostrea rhizophorae* que foram analisadas. Silva et al (2013) alertam para os efeitos deletérios de agentes inibidores da polimerização, potencialmente presentes em amostras utilizadas para a detecção de *Cryptosporidium*. Além disso, apontam que os *amplicons* de grande extensão, particularmente comuns nos protocolos para detecção deste parasito, são especialmente sensíveis aos efeitos deletérios destas substâncias inibidoras. Desta forma propuseram novos oligonucleotídeos iniciadores baseados da unidade ribossomal 18S. Os novos oligonucleotídeos foram hábeis em detectar até  $10^{-1}$  oocistos por mL, enquanto que a literatura aponta sensibilidade analítica de 10 oocistos por mL com outros protocolos. As sequências propostas por Silva et al (2013) foram as mesmas utilizadas no presente trabalho.

Devido a não existência, ainda, de uma técnica considerada ideal para a pesquisa de *Cryptosporidium* nestes animais, muitos pesquisadores tem realizado pesquisas experimentais a fim de determinar aquela mais adequada. Sendo assim, a imunofluorescência é utilizada com mais frequência, pois é considerada de fácil manipulação

e de rápido diagnóstico, enquanto as técnicas moleculares mesmo apontadas como mais sensíveis na detecção de oocistos em amostras teciduais, têm um alto custo e diagnóstico mais demorado, sendo esta a mais utilizada na confirmação de amostras positivas e determinação de genótipos.

Embora a literatura nacional não registre a pesquisa de DNA de *Cryptosporidium* em ostras, este protozoário já foi pesquisado e encontrado utilizando-se outras técnicas de detecção. Leal et al (2008) examinando amostras teciduais de bivalves, através da técnica de imunofluorescência e microscopia de contraste de fase, relataram no litoral de São Paulo a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp em concentrações médias variando de 12 a 60 oocistos/animal em duas espécies diferentes, *Crassostrea rhizophorae* e *Tivela mactroides*, moluscos bivalves muito consumidos no Brasil e em outros países da América do Sul.

Existem diversos relatos em várias regiões do mundo sobre a detecção de oocistos deste parasito em bivalves infectados naturalmente (GÓMEZ-BAUTISTA et al, 2000; FAYER et al, 2002, 2003; GÓMEZ-COUSO et al, 2004, 2006a, 2006b; GIANGASPERO et al, 2005; TRAVERSA et al, 2004; MILLER et al, 2005; LI et al, 2006; GRACZYK et al, 2007a). Por este motivo, os resultados positivos quanto à presença deste patógeno nestes moluscos tem sido considerado um sinal de alerta, uma vez que quadros clínicos de criptosporidiose podem desenvolver-se em humanos, principalmente, pessoas imunossuprimidas ou imunodeficientes (FAYER et al, 2004; ROSE, 1997).

Ainda que a quantidade de oocistos ingeridos necessários para provocar uma infecção humana ainda não seja um consenso na comunidade científica (PALOS LADEIRO et al, 2013), por considerar este protozoário uma ameaça a vida, e o fato dele poder ser encontrado em frutos do mar como ostras, Leal et al (2008) entendem que estes alimentos deveriam ser envolvidos na epidemiologia das doenças provocadas por ingestão de alimentos.

No caso de ambientes aquáticos, a permanência de formas infectantes pode estar relacionada com fatores como, salinidade e precipitação. Em um estudo realizado por Fayer et al 2002, durante um período de três anos na Baía de Cheseapeake (USA) foi

possível verificar um maior nível de contaminação de ostras da espécie *Crassostrea virginica* com oocistos de *Cryptosporidium*, após os períodos de alta precipitação, sendo assim Fayer et al (2003) ao verificarem uma baixa prevalência na contaminação de bivalves por este protozoário relacionou estes achados ao períodos de baixa precipitação o qual ocorreram as coletas.

Francavilla et al (2012) ao investigarem a presença de oocistos em quatro espécies de moluscos (*Mytilus galloprovincialis*, *Ruditapes (Tapes) decussatus*, *R Ruditapes (Tapes) philipinarum* e *Crassostrea gigas*) na Itália, utilizando as técnicas de imunofluorescência, PCR e *nested*-PCR, verificaram ausência de oocistos para as técnicas utilizadas, corroborando assim com o resultado de Giangaspero et al (2009), que também não encontraram amostras positivas, mesmo examinando uma área onde ocorria descarga de efluentes de origem urbana. Para estes autores a contaminação de bivalves está relacionada com outros fatores além da presença de formas infectantes de microorganismos patogênicos no ambiente. No presente trabalho em apenas uma das coletas houve registro de chuva na mesma semana, o que eventualmente pode ser um fator influenciando os resultados apresentados.

Com o intuito de chamar a atenção para a possibilidade da contaminação de ostras, na Holanda, com microorganismos patogênicos e o seu impacto na saúde pública, Schets et al (2007), examinando amostras de lavados de brânquias e filtrados de glândulas intestinais de bivalves através de imunofluorescência, observaram presença de oocistos, embora não tenham conseguido relacionar fatores ambientais observados e a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em organismos da espécie *Crassostrea gigas*, uma vez que o evento de forte precipitação de um período teve menor impacto do que o aumento da população humana, devido a presença de turistas, em um outro período com precipitação normal, e assim foi observada uma maior prevalência no período de precipitação normal.

A detecção de DNA compatível com *T.gondii* neste estudo corrobora os resultados de Ribeiro (2013), que detectou pela primeira vez no litoral sul da Bahia DNA de *T.gondii* em *Crassostrea*. Esses achados servem de alerta, pois se a ostra foi capaz de concentrar oocistos em seus tecidos provavelmente as formas infectantes deste parasito

estão presentes na água. Estudos confirmam a capacidade que os oocistos tem de acumular e permanecer infectante em tecidos e glândulas digestivas de bivalves (LINDSAY et al, 2001; ARKUSH et al, 2003; FAYER et al, 2004; LINDSAY et al, 2004) como, ostras, sugerindo assim, que o consumo deste animal cru deve ser evitado.

Putignani et al (2011) observaram pela primeira vez na Itália o DNA do *T.gondii* em bivalves da espécie, *Crassostrea gigas* (brânquias) e *Tapes decussatus* (hemolinfa), encontrando positividade em 16% das amostras de brânquias e em 7% das amostras de hemolinfa, o que representou o primeiro registro na Europa, demonstrando assim a capacidade destes bivalves reter tal protozoário, devido a sua intensa atividade filtradora.

Miller et al (2008) pesquisaram oocistos de *T.gondii* em 1109 bivalves não comestíveis e obtiveram uma taxa de positividade de 0,007%. O encontro deste patógeno em bivalves de mesma linhagem genética que aqueles encontrados em mamíferos marinhos e felídeos silvestres que ocupam uma mesma área na Califórnia, fez com que os autores suspeitassem, que estas três espécies podem fazer parte de uma única via de transmissão, sendo os felídeos responsáveis pela contaminação do solo com oocistos que ao ser carregado para o ambiente marinho são retidos pelos bivalves e estes por ser preferência alimentar de lontras marinhas, ao serem consumidos transmitem os parasitos que podem desenvolver infecções nestes mamíferos marinhos. Para os autores esses achados configuram o potencial risco tanto à saúde dos mamíferos marinhos como do ser humano, sendo a lontra marinha estudada um indicador sensível deste perigo.

Recentemente, Zhang et al (2014) ao pesquisarem oocistos de *T.gondii* em oito diferentes espécies de animais aquáticos na China, encontraram uma espécie de camarão (0,6%), uma espécie de peixes (0,8%) e uma espécie de lagostim (2,5%) infectados, e apesar de não registrar o parasito em ostras, afirma que a ocorrência de *T.gondii* em animais aquáticos não deve ser ignorada.

A presença de formas infectantes de protozoários patogênicos em bivalves tem sido alvo de pesquisas em muitas regiões do mundo e tem sido relacionada com a presença de oocistos liberados no ambiente através das fezes dos hospedeiros o que

provoca contaminação do solo e conseqüentemente, ao serem transportados pela chuva contaminam a água e organismos presentes, como é o caso dos moluscos bivalves (MILLER et al, 2002; FAYER et al, 2004).

No presente estudo foi observado positividade de 65,6% nos grupos de glândulas e 34,4% em brânquias. No trabalho realizado por Ribeiro (2013) o exame das brânquias foi mais efetivo na determinação da presença de DNA de *T. gondii*, com 76,5% dos positivos. Para Arkush et al (2003), a retenção de formas infectantes nos bivalves pode ser reflexo de um contato recente ou mais antigo, quando ocorre nas brânquias ou nas glândulas, respectivamente, já que os autores observaram que naqueles bivalves examinados logo após a exposição havia mais detecção de oocistos nas brânquias enquanto aqueles analisados em um tempo maior foram detectados mais nas glândulas. De forma semelhante, Palos Ladeiro et al (2014) apontam que a quantificação de DNA de *T. gondii* em *Dreissena* foi maior em músculos e brânquias aos um e três dias pós-contaminação, quando comparados com a glândula digestiva, com resultados similares para os três tecidos aos sete dias pós-contaminação. Assim, nossos resultados podem refletir uma exposição crônica ou mais antiga ao parasito.

Foi possível verificar ainda uma maior prevalência entre os grupos de brânquias no ponto VC1, que apresentou positividade de 9,75% para o DNA compatível com *T.gondii*, o que pode sugerir contato recente do animal com os oocistos, enquanto a positividade de 22,86% nos grupos de glândulas do ponto CH1 sugere presença do oocisto no ambiente há mais tempo. Palos Ladeiro et al (2014) determinaram que *Dreissena polymorpha* experimentalmente expostas à oocistos de *T. gondii* acumulam mais parasitos de acordo com o tempo de exposição (de zero a sete dias), independente do tecido examinado, sendo assim, é provável que as ostras que estejam há mais tempo mais expostas se apresentem mais frequentemente contaminadas. Uma hipótese é que as ostras analisadas neste estudo estiveram expostas às prováveis formas infectantes durante períodos diferentes de tempo.

Quando comparadas as amostras de todos os pontos de coleta, apesar do índice de positividade se apresentar maior nos grupos de glândulas, o teste de McNemar

não revelou associação entre o tipo de tecido avaliado e a amplificação de DNA. Isso sugere que ambos os tecidos sejam examinados para avaliar a presença do parasito.

Embora os cinco pontos de coleta deste estudo apresentem características semelhantes, o maior índice de positividade em CH1 16,2%, pode estar relacionado com a proximidade deste ponto a locais onde ocorra o escoamento de águas superficiais contendo terra contaminada com fezes de animais presentes na região. Nesse contexto, a contaminação do ambiente terrestre com fezes de felinos poderia ser a fonte de contaminação dos ambientes aquáticos adjacentes.

O grau de impactação do ambiente terrestre próximo aos locais de origem dos moluscos pode ser determinante na contaminação do ambiente marinho adjacente. Shapiro et al (2010) mimetizaram o comportamento de oocistos de *T. gondii* liberados em águas costeiras utilizando partículas auto-fluorescentes de poliestireno. A recuperação das partículas foi maior nas áreas mais degradadas, sendo que em áreas com 36% de perda de vegetação a recuperação foi duas vezes maior do que em áreas não impactadas, havendo até seis vezes mais recuperação em áreas mais intensamente degradadas. Hogan et al (2013) reforçam estes resultados, demonstrando experimentalmente que entre a salinidade, a temperatura, o tipo de água, o fluxo da coluna d'água e a presença de vegetação, apenas o aumento da salinidade e a presença de vegetação foram fatores significantes na remoção de protozoários parasitos em sistemas de transporte unidirecional. No ponto CH1, especialmente, observou-se que não havia vestígios de mata ciliar.

Sroka et al (2010) apontam os ambientes rurais com capacidade de reter maior numero de oocistos em suas terras superficiais, por conterem diferentes animais capazes de atuar como hospedeiros intermediários e definitivos. Assim ao analisarem água potável de fazendas na Polônia, encontraram 12,6% e 22,5% das amostras de água potável, pela microscopia e pela PCR, respectivamente, positivas para a presença de *T. gondii*.

Para Ribeiro (2013) fatores como alto índice pluviométrico da região Sul da Bahia e ausência de saneamento básico podem estar influenciando no índice de prevalência (8,1%) em seu estudo, que foi o primeiro no nordeste brasileiro a identificar o DNA de *T. gondii* em amostras teciduais de ostras provenientes do cultivo e extrativismo. No presente

trabalho não foi possível estabelecer uma relação entre o índice pluviométrico e a positividade das ostras.

Poucos trabalhos tem investigado a interação de fatores que possam levar a contaminação das águas costeiras com oocistos de *T. gondii* e mesmo de outros parasitos. Simon et al (2013) propõem um modelo em que o degelo de verão nas regiões árticas possibilitaria o transporte de oocistos do solo e outras fontes para as águas costeiras. É possível que, em climas tropicais, e na presença de várias espécies de felídeos potencialmente contaminadores do solo com oocistos, o transporte se dê da terra para as águas costeiras de forma mais contínua, com picos de disseminação nas épocas mais chuvosas do ano.

Ainda não existe uma uniformidade nas técnicas moleculares de detecção de *T. gondii* em moluscos bivalves. Nos trabalhos realizados no Brasil também existe uma grande variação de técnicas. Esmerini et al (2010) utilizaram uma *nested*-PCR para o gene B1, Ribeiro (2013) comparou uma PCR simples para gene repetitivo e uma *nested*-PCR para o gene SAG1, enquanto neste trabalho utilizamos uma *nested*-PCR para a subunidade ribossomal 18S seguida de clivagem enzimática. Existem potenciais diferenças de sensibilidade analítica entre as técnicas, o que aliado à dificuldade de recuperação de DNA de oocistos de *Toxoplasma* e de amostras provenientes de ambientes potencialmente contaminados, dificultam a comparação de resultados. Além disso, nos trabalhos supracitados, foram utilizados diferentes métodos de extração de DNA.

## CONCLUSÕES

As conclusões deste estudo foram:

1. A amplificação do material genético compatível ao de *Toxoplasma gondii* nas ostras analisadas indica que estes moluscos podem ser fontes potenciais de contaminação para seres humanos e outros animais.

2. Os indivíduos coletados no ponto de coleta CH1 apresentaram diferença significativa quanto à presença do material genético pesquisado, em relação aos outros pontos de coleta.

3. Não há diferença estatística significativa entre a origem e a presença de DNA compatível com *T.gondii* nas ostras, assim como, não há diferença significativa na correlação entre as médias das variáveis morfométricas e a porcentagem de positividade nas brânquias e glândulas.

4. Não houve associação significativa quando analisadas as amostras teciduais de brânquias e glândulas quanto à positividade para o DNA compatível com *T.gondii*.

5. O ambiente marinho da Baía de Todos os Santos contém oocistos de *T.gondii*, provavelmente, inseridos pelo escoamento da superfície de terra contaminada com fezes de felídeos presentes na região.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARKUSH, K.D. et al. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal for Parasitology**, v.33, n.10, p.1087-1097, 2003.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2007. 364p.
- BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. et al. Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.1, p.55-62, 2003.
- BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, p.607-623, 2013.
- BOEHS, G. et al. **Parasitas e patologias de bivalves marinhos de importância econômica da costa Brasileira**. Disponível em: <[http://rho.uesc.br/cursos/pos\\_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2011/guisla\\_livro\\_boehs.pdf](http://rho.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2011/guisla_livro_boehs.pdf)> Acesso em: 10 mar. 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>> Acesso em: 05 mai. 2013.
- CACCIÒ, S. M. et al. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v.21, n.9, p. 430-436, 2005.
- CARROZZO G. **Contaminação bacteriana em bivalves comestíveis da Enseada dos Tainheiros e comercializados em feiras livres de Salvador**. Monografia apresentada ao Instituto de Biologia da UFBA, Salvador/BA, 1994.
- COLLIER, S.A. et al. Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water. **Epidemiology and Infection**, v. 140, n. 11, p. 2003-2013, 2012.
- COULLIETTE, A. D. et al. *Cryptosporidium parvum*: treatment effects and the rate of decline in oocyst infectivity. **The Journal of Parasitology**, v. 92, n. 11, p. 58-62, 2006.
- CUÑA CASASBELLAS, M. **Instalaciones en el criadero de moluscos**. *Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura. Xunta de Galicia* (1991).
- DABRITZ, H.A.; CONRAD, P.A. Cats and Toxoplasma: Implications for Public Health. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n.1, p.34-52, 2010.
- DA SILVA, R.C.; SU, S.; LANGONI, H. First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.165, n.3-4, p.332-336, 2009.
- DAWSON, D. Foodborne protozoan parasites. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 2, p.207-227, 2005.

DEAN, A. G. et al. **Epi Info™, a database and statistics Program for Public Health Professionals**. CDC, Atlanta, GA, USA, 2011.

DOWNEY, A. S.; GRACZYK, T. K. Maximizing recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from spiked eastern oyster (*Crassostrea virginica*) tissue samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 21, p. 6910-5, Nov 2007. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17827306> >. Acesso em 10 mar. 2012.

DUBEY, J.P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v.92, n.1, p.36-40, 2006.

DUBEY, J.P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **Journal of Parasitology**, v.87, n.1, p.215-219, 2001.

DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.28, n.7, p.1019-24, 1998.

DUBEY, J.P. et al. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 83, n.5, p. 870-882, 1997.

DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v.64, n. 1-2, p.65-70, 1996.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: KREIER, J.P. **Parasitic Protozoa**, New York: Academic Press, v.3, p.101-66, 1979.

DUMÈTRE, A. et al Interaction Forces Drive the Environmental Transmission of Pathogenic Protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 905-912, 2012. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/78/4/905.abstractN2> > Acesso em 13 jan. 2013.

ESMERINI, P.O.; GENNARI, S.M.; PENA, H.F.J. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 8-13, 2010.

FARTHING, M. J. Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, n.8, p. 436-445, 2006.

FAYER, R.; DUBEY, J.E.; LINDSAY, D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, v.20, n.1, p.531-536, 2004.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J. M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**, v. 156, n.3-4, p. 191-198, 2008.

- FAYER, R. et al. Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. **Parasitology Research**, v. 89, n.2, p.141- 145, 2003.
- FAYER, R. et al. Temporal variability of cryptosporidium in the chesapeake bay. **Parasitology Research**, v.88, n.11, 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.12-13, p.1305-1322, 2000.
- FAYER, R. et al. Potential role of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in the epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, n.5, p. 2086- 2088, 1997.
- FERREIRA, E.C. et al. Association between seropositivity for *Toxoplasma gondii*, scholastic development of children and risk factors for *T. gondii* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.107, n. 6, p. 390-396, 2013.
- FLEGR, J. et al. Increase incidence of traffic accidents in *Toxoplasma*-infected military drivers and protective effect RhD molecule revealed by a large-scale prospective cohort study. **BMC Infectious Disease**, v. 9, p.72-79, 2000. doi: 10.1186/1471-2334-9-72. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/72>> Acesso em: 02 dez. 2013.
- FRANCAVILLA, M. et al. Environmental conditions in a lagoon and their possible effects on shellfish contamination by *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Aquaculture International**, v.20, n. 4,p.707–724, 2012.
- FRANCO, R.M.B.; BRANCO, N.; LEAL, D.A.G. Parasitologia Ambiental: Métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n.2, p. 119-135, 2012. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/19320>> Acesso em: 23 fev. 2013.
- FRENKEL, J.K.; DUBEY,J.P.;MILLER, N.L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 893-896, 1970. DOI:10.1126/science.167.3919.893. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/167/3919/893.long>> Acesso em: 20 nov. 2013.
- GIANGASPERO,A. et al. *Giardia* and *Cryptosporidium* in inflowing water and harvested shellfish in a lagoon in southern Italy. **Parasitology International**, v.58, n.1, p. 12-17, 2009.
- GIANGASPERO, A. et al. *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater clams (*Chamelea gallina*) in Italy. **Preventive Veterinary Medicine**, v.69, n.3-4, p.203-212, 2005.
- GÓMEZ-BAUTISTA, M. et al. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). **Applied Environmental Microbiology**, v.66, n.5, p.1866-1870, 2000.

GÓMEZ-COUSO, H.; MÉNDEZ-HERMIDA, F.; ARES-MAZÁS, E. Levels of detection of *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by IFA and PCR methods. **Veterinary Parasitology**, v.141, n.1-2, p.60-65, 2006b.

GÓMEZ-COUSO, H. et al. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. **Journal of Food Protection**, v. 69, n.1, p.185-190, 2006a.

GÓMEZ-COUSO, H. et al. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, n.3, p. 279- 288, 2004.

GÓMEZ-COUSO, H. et al. Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 1-2, p.97- 105, 2003.

GONÇALVES, R.S.L.; FREIRE, G.S.S.; NETO, V.A.N. Determinação das concentrações de cádmio, cobre, cromo e zinco, na ostra *Crassostrea rhizophorae* dos estuários dos rios Cocó e Ceará. **Revista de Geologia**, v.20, n.1, p. 57-63, 2007.

GRACZYK, T. K. et al. Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake bay. **Parasitology Research**, v. 100, n.2, p.247-253, 2007.

GRIFFITHS, J. K. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis. **Advances in Parasitology**, v.40, n.1, p.37-85, 1998.

HATJE, V.; ANDRADE, J.B (org). **Baía De Todos os Santos: Aspectos Oceanográficos**. Salvador: EDUFBA, 2009. 306p.:il.

HELLARD, M. E. et al. Prevalence of enteric pathogens among community based asymptomatic individuals. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.15, n.3, p.290-293, 2000.

HICKMAN, C.P.; ROBERTS Jr. L.S.; LARSON, A. **Integrated Principles of Zoology**. 11<sup>th</sup> ed, New York: McGraw-Hill Companies, 2001. 889p.:il.

HOGAN, J.N. et al. Hydrologic and vegetative removal of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, and *Toxoplasma gondii* surrogate microspheres in coastal wetlands. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.6, p.1859-1865, 2013.

JONES, J.L.; DUBEY, J.P. Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.10-25, 2010.

KARANIS, P. et al. The impact of waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: an overview and update. **Environmental Science and Pollution Research**, v.20, n.1, p. 86-99, 2013.

LEAL, D.A.G.; FRANCO, R.M.B. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.10, n.4, p.48-57, 2008.

LEAL, D. A. G. et al. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil. **Journal of Water and Health**, v.6, n.4, p.527-532, 2008.

LEAL, D. A. G. et al. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. **Ocean & Coastal Management**.v.72, n.1, p.93-100, 2013.

LEVINE, N. D. **The protozoan Phylum Apicomplexa**. Vol.I e II. CRC Press, Inc., ed Boca Raton, Florida. 1988.

LI, X.D. et al *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n.3, p.321-325, 2006.

LINDSAY, D.S. et al. Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Parasitology**, v.90, n.5, p.1054–1057, 2004.

LINDSAY, D.S. et al. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, Suppl., p.687-688, 2003.

LINDSAY, D.S. et al. Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, Suppl., p.197-198, 2001. Suplemento.

LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L., DUBEY, J.P. Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst. **The compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, v.19, p.448-61, 1997.

MEAD, P.S. et al. Food related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, n. 6, p. 607-25, 1999.

MILLER, M.A. et al. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: New linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n.11, p. 1319-1328, 2008.

MILLER, W.A. et al. New genotypes and factors associated with *cryptosporidium* detection in mussels (*mytilus* spp.) along the california coast. **International Journal for Parasitology**, v.35, n.10, p.1103-1013, 2005.

MILLER, M.A. et al Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutrisnereis*). **International Journal for Parasitology**, v.32, n.8, p.997-1006, 2002.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infection Genetics and Evolution**, v.3, n.4, p.233-244, 2003.

NASCIMENTO, I.A. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *brasiliiana* (Lamarck) in South and America Central. In: Menzel W (ed) Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture. Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 125-134.

NEVES, D.R. **Parasitologia Humana**, 11ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494p.

OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L. *Cryptosporidium* virulence determinants – are we there yet? **International Journal for Parasitology**, v.32, n.5, p.517–525, 2002.

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

PALOS LADEIRO, M.P. et al. Protozoa interaction with aquatic invertebrate: interest for water courses biomonitoring. **Environmental Science and Pollution Research International**, v.20, n.2, p.778–789, 2013.

POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. **Clinical Infectious Diseases**, v.35, n.8, p.921- 928, 2002.

PUTIGNANI, L. et al. Investigation of *toxoplasma gondii* presence in farmed shellfish by nested-PCR and real-time PCR fluorescent amplicon generation assay (FLAG). **Experimental Parasitology**, v.127, n.2, p.409-417, 2011.

RIBEIRO, L.A. **Identificação de DNA de *Toxoplasma gondii* através do método de reação em cadeia pela polimerase (PCR) em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) do litoral sul da Bahia**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Ilhéus, 2013.

RIOS, E.C. **Seashells of Brasil**. Rio Grande: FURG (Universidade Federal do Rio Grande), 1994. 492p.

RIPPEY, S. R. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, n.4, p.419-425, 1994.

ROBERTSON, L. J. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, n.3, p.201-216, 2007.

ROBERTSON, L. J.; GJERDE, B. K. *Cryptosporidium* oocysts: challenging adversaries? **Trend in Parasitology**, v.23, n.8, p.344-347, 2007.

ROSE, J. B. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. **Annual Review of Public Health**, v.18, p. 135-61, 1997

RUPPERT, E.E; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 6ªed. São Paulo: Roca, 1996. 1029p.

SALATI, E.; LEMOS, H. M.; SALATI, E. Água e o Desenvolvimento Sustentável. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B. e TUNDISI, J.G. (Org.). **Águas Doces no Brasil – Capital Ecológico, Uso e Preservação**. 2ªed. São Paulo: Escrituras, 2002, p. 39-63.

SAUVÉ, S. et al. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). **Aquatic Toxicology**, v.58, n.3-4, p.189-200, 2000.

SCHETS, F.M. et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, n.2, p.189-194, 2007.

SHAPIRO, K. et al. Effect of estuarine wetland degradation on transport of *Toxoplasma gondii* surrogates from land to sea. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.20, p.6821-6828, 2010.

SILVA, S.O.S. et al. A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. **Experimental Parasitology**, v. 135, n.3, p. 551-557, 2013.

SIMON, A. et al. Fate and transport of *Toxoplasma gondii* oocysts in seasonally snow covered watersheds: a conceptual framework from a melting snowpack to the Canadian arctic coasts. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.10, n.3, p.994-1005, 2013.

SLIFKO, T. R.; SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1379- 1393, 2000.

SMITH J.L. Long-term consequences of foodborne toxoplasmosis: effects on the unborn, the immunocompromised, the elderly, and the immunocompetent. **Journal of Food Protection**, v.60, n.12, p.1595-611, 1997.

SMITH, H. V. et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v.149, n.1-2(SI), p.29-40, 2007.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology**, v.124, n.1, p.61-79, 2010. Disponível em: <<Goto ISI>://WOS:000274134700009 >. Acesso em: 25 set 2012.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne cryptosporidiosis: current status. **Parasitology Today**, v.14, n.1, p.14-22, 1998.

SODRÉ, F. C.; FRANCO, R. M. B. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.33, n.2, p.97-106, 2001.

SOUZA, D.S.M. et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.76, n.2, p.153-161, 2012.

SROKA, J. et al. The occurrence of *Toxoplasma gondii* infection in people and animals from rural environment of Lublin region – Estimate of potential role of water as a source if infection. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.17, n.1, p.125-132, 2010.

SUNNOTEL, O. et al. Under the microscope, Cryptosporidium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n.1, p. 7-16, 2006.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1217-1258, 2000.

TENTER A.M. Current Knowledge on the Epidemiology of Infections with *Toxoplasma*. **The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 23, n.6, p. 391, 1999.

TENTER A.M; JOHNSON A.M. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. **Advances in Parasitology**, v.39, n.1, p. 69-139, 1997.

TENTER, A.M.; VIETMEYER, C.; JOHNSON, A.M. Development of ELISAs based on recombinant antigens for the detection of *toxoplasma gondii*-specific antibodies in sheep and cats. **Veterinary Parasitology**, v. 43, n.3-4, p. 189-201, 1992.

THOMPSON, R.C.A. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. **International Journal for Parasitology**, v.43, n.12-13, p.1079-1088, 2013.

THOMPSON, R.C.A.; SMITH, A. Zoonotic enteric protozoa. **Veterinary Parasitology**, v.182, n.1, p.70-78, 2011.

TORGERSON, P.R. One World Health: Socioeconomic burden and parasitic disease control priorities. **Veterinary Parasitology**, v.195, n.3-4, p.223-232, 2013.

TORREY, E.F.; YOLKEN, R.H. Toxoplasma oocysts as a public health problem. **Trends in Parasitology**, v.29, n.8, 2013. doi: 10.1016/j.pt.2013.06.001. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492213000901> > Acesso em 02 ago. 2013.

TORREY, E.F.; YOLKEN, R.H. Schizophrenia and toxoplasmosis. **Schizophrenia bulletin**, v.33, n.3, p.727-728, 2007.

TRAVERSA, D. et al. Genotyping of *cryptosporidium* isolates from *chamelea gallina* clams in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.7, p.4367-70, 2004.

UN-WATER. Coping with water scarcity. A strategic issue and priority for system-wide action August, 2006. Disponível em: < <http://www.unwater.org/downloads/waterscarcity.pdf> >. Acesso em: 23 mai. 2012.

WEBSTER, J.P. et al. Parasites as causative agents of human affective disorders? The impact of anti-psychotic, mood-stabilizer and anti-parasite medication on *Toxoplasma gondii*'s ability to alter host behavior. **Proceedings of the Royal society Biological Sciences**, v.273, n.1589, p.1023-30, 2006.

WILLIS, J. E. et al. Global occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in shellfish: Should Canada take a closer look? **Food Research International**, v.52, n.1, p.119-135, 2013. ISSN 0963-9969. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913001130> >. Acesso em: 02 jun. 2013.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION (WHO). **The Control of Neglected Zoonotic Diseases**. Geneva, Nov 2010. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44746/1/9789241502528\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44746/1/9789241502528_eng.pdf)> Acesso em: 15 Dez.2012.

WONG, S-Y.; REMINGTON, J.S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**, v.7, n.3, p.299-316, 1993.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v.38, n.11, p.1239-1255, 2008. ISSN 0020-7519. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751908001094> > Acesso em: 10 jun.2012.

ZHANG, M. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in shellfish and fish in Parts of China. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 1-2, p.85-89, 2014.

## ANEXO

Tabela 7. Estatísticas descritivas da avaliação biométrica de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em Vera Cruz, BA, segundo a coleta. Feira de Santana, 2013.

Variável	Coleta	N	Média	Dp	Min	P25	Med	P75	Max
Comprimento da concha (mm)	1	60	6,25	0,41	5,20	5,95	6,30	6,50	7,40
	2	65	6,13	0,52	5,30	5,70	6,10	6,50	8,00
	3	55	5,99	0,57	4,70	5,60	6,00	6,40	7,10
	4	124	5,67	0,74	4,20	5,10	5,70	6,10	7,60
Altura da concha (mm)	1	60	1,89	0,32	1,30	1,70	1,90	2,10	2,80
	2	65	1,88	0,32	1,10	1,70	1,90	2,10	2,80
	3	55	1,72	0,35	1,00	1,50	1,80	1,90	2,50
	4	124	1,30	0,31	0,70	1,00	1,30	1,50	2,10
Massa com concha (g)	1	60	26,31	4,16	19,70	23,65	25,55	28,35	39,80
	2	65	25,33	4,29	18,20	22,00	24,60	28,30	38,60
	3	55	25,20	6,72	16,40	19,80	23,80	29,80	42,40
	4	124	13,89	4,20	5,51	10,70	13,26	15,99	31,38
Comprimento sem concha (mm)	1	60	3,81	0,29	3,10	3,60	3,80	4,00	4,50
	2	65	3,74	0,32	3,00	3,50	3,70	4,00	4,60
	3	55	3,79	0,38	2,80	3,60	3,80	4,10	4,50
	4	124	2,97	0,66	1,80	2,40	2,90	3,40	4,70
Massa sem concha (g)	1	60	2,91	0,68	1,50	2,42	2,96	3,35	5,18
	2	65	2,62	0,64	1,48	2,16	2,54	2,99	4,47
	3	55	2,43	0,75	0,77	1,91	2,44	2,80	4,24
	4	124	1,46	0,50	0,59	1,07	1,39	1,73	2,81
Massa das brânquias (g)	1	60	0,39	0,12	0,19	0,32	0,38	0,49	0,70
	2	65	0,40	0,10	0,16	0,35	0,40	0,47	0,71
	3	55	0,42	0,13	0,14	0,32	0,41	0,49	0,80
	4	124	0,23	0,07	0,05	0,18	0,23	0,27	0,40
Massa da glândula digestiva (g)	1	60	0,51	0,11	0,25	0,44	0,51	0,57	0,78
	2	65	0,44	0,10	0,24	0,38	0,43	0,48	0,74
	3	55	0,36	0,10	0,13	0,28	0,36	0,42	0,61
	4	124	0,24	0,24	0,09	0,16	0,21	0,26	2,72

**Legenda:** N=número, Dp=desvio-padrão, Min=mínimo, P25=percentil 25%, Med=mediana, P75=percentil 75%, Máx=máximo.

Tabela 8. Estatísticas descritivas da avaliação biométrica de *Crassostrea rhizophorae* coletadas em Cachoeira, BA, segundo a coleta. Feira de Santana, 2013.

Variável	Coleta	N	Média	Dp	Min	P25	Med	P75	Max
Comprimento da concha (mm)	1	25	9,73	0,89	8,20	9,10	9,60	10,00	12,40
	2	60	8,76	0,93	7,10	8,00	8,70	9,35	10,60
	3	100	8,82	1,22	6,20	7,85	8,70	9,50	13,50
	4	126	9,91	1,38	7,40	8,90	9,90	10,90	13,70
Altura da concha (mm)	1	25	3,08	0,52	2,10	2,70	2,90	3,50	4,20
	2	60	3,04	0,61	1,70	2,60	3,00	3,40	4,40
	3	100	3,95	0,54	2,00	2,50	2,90	3,30	4,70
	4	126	3,32	0,58	2,10	2,90	3,30	3,60	4,90
Massa com concha (g)	1	25	117,79	24,21	80,00	94,70	117,50	137,50	159,60
	2	60	103,19	36,42	44,30	78,15	97,80	118,40	217,30
	3	100	97,71	33,86	43,70	69,35	94,20	123,45	189,50
	4	126	132,06	30,91	67,60	110,60	127,20	148,40	235,70
Comprimento sem concha (mm)	1	25	5,61	0,77	3,90	5,20	5,60	5,90	7,50
	2	60	5,55	0,74	3,90	5,10	5,50	6,05	7,10
	3	100	5,54	0,74	4,00	5,05	5,40	6,00	7,70
	4	126	6,18	0,96	3,90	5,50	6,20	6,90	8,50
Massa sem concha (g)	1	25	7,29	1,75	3,73	6,38	7,54	8,85	9,72
	2	60	7,55	2,52	3,11	5,81	7,54	8,67	16,99
	3	100	7,60	2,25	3,62	5,94	7,28	9,05	13,76
	4	126	8,08	2,06	3,81	6,49	8,08	9,15	14,13
Massa das brânquias (g)	1	25	1,13	0,28	0,62	0,91	1,11	1,23	1,71
	2	60	1,03	0,31	0,43	0,86	0,99	1,26	1,64
	3	100	1,09	0,36	0,42	0,82	1,03	1,30	2,10
	4	126	1,18	0,31	0,40	0,97	1,17	1,42	1,92
Massa da glândula digestiva (g)	1	25	0,84	0,21	0,44	0,66	0,83	1,00	1,23
	2	60	0,79	0,24	0,37	0,63	0,79	0,90	1,47
	3	100	0,75	0,24	0,30	0,59	0,70	0,92	1,36
	4	126	0,86	0,20	0,43	0,70	0,85	1,01	1,46

**Legenda:** N=número, Dp=desvio-padrão, Min=mínimo, P25=percentil 25%, Med=mediana, P75=percentil 75%, Máx=máximo.