

**JOÃO CARLOS GOMES BORGES**

***Cryptosporidium* spp. (Tyzzer, 1907) EM PEIXES-BOI MARINHOS  
(*Trichechus manatus*) (Linnaeus, 1758) E PEIXES-BOI  
AMAZÔNICOS (*Trichechus inunguis*) (Natterer, 1883)  
NO BRASIL**

**RECIFE**

**2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**JOÃO CARLOS GOMES BORGES**

***Cryptosporidium* spp. (Tyzzer, 1907) EM PEIXES-BOI MARINHOS  
(*Trichechus manatus*) (Linnaeus, 1758) E PEIXES-BOI  
AMAZÔNICOS (*Trichechus inunguis*) (Natterer, 1883)  
NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

**RECIFE**

**2007**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

*Cryptosporidium* spp. (Tyzzer, 1907) EM PEIXES-BOI MARINHOS  
(*Trichechus manatus*) (Linnaeus, 1758) E PEIXES-BOI  
AMAZÔNICOS (*Trichechus inunguis*) (Natterer, 1883)  
NO BRASIL

Dissertação de Mestrado elaborado por  
**JOÃO CARLOS GOMES BORGES**

Aprovada em ...../...../.....

**BANCA EXAMINADORA:**

ORIENTADOR:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

EXAMINADORES:

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Erilane de Castro Lima Machado

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Aparecida da G. Faustino

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Quintino e Silaine, por todo amor dedicado a nossa família, pela perseverança e determinação em tornar possíveis os meus sonhos; as minhas irmãs e sobrinhos, por todo o carinho demonstrado.

Mediante a impossibilidade de concretizar um de seus objetivos profissionais relacionados à conquista de uma pós-graduação, mencionado inúmeras vezes durante o curso de veterinária, dedico este trabalho à eterna lembrança de um grande amigo, MARCOS AURÉLIO (“*in memoriam*”);

## AGRADECIMENTOS

- A DEUS, por ter proporcionado e permitido a realização de todas as minhas conquistas;
- A Daiane Anzolin, pelo incentivo, compreensão, carinho, satisfação, amor... muito além de palavras;
- Ao professor, orientador e amigo, Leucio Câmara Alves, exemplo de hombridade, dedicação e ética profissional;
- A Dra. Miriam Marmontel, pela confiança, ensinamentos e participação efetiva durante todas as etapas de coleta do material biológico de peixes-boi amazônicos nativos e por viabilizar parte do suporte logístico requerido na execução desta pesquisa;
- A Profa. Dra. Maria Aparecida da Gloria Faustino, pela cordialidade, ensinamentos e contribuições diversas;
- A Prof. Dra. Erilane de Castro Lima Machado, por ter ensinado a dar os primeiros passos rumo à pesquisa de *Cryptosporidium*, pela confiança e material disponibilizado;
- Ao Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva, sempre demonstrando grande motivação profissional, pelo incentivo nas atividades de pesquisa, sobretudo ligadas à conservação de espécies ameaçadas;
- Aos amigos Cristiano Parente, Jociery Vergara-Parente, Danielle Lima, Magnus Severo, por terem ajudado desde o início das atividades relacionadas ao mestrado, pelo exemplo de profissionalismo e pelas diversas críticas e sugestões;
- Ao Régis Pinto de Lima e Denise Freitas de Castro, representantes institucionais do Centro Mamíferos Aquáticos/IBAMA e Fundação Mamíferos Aquáticos respectivamente, pela contribuição no suporte logístico;
- A Cristina Roiz, por todo o apoio e incentivo;
- A Fábila Luna e Carla Aguilar, por toda a contribuição nas atividades relacionadas aos peixes-boi amazônicos cativos;
- A todos os funcionários e estagiários do Centro Mamíferos Aquáticos, Fundação Mamíferos Aquáticos, Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá e do Conselho Nacional dos Seringueiros, em especial aos três grandes professores, Sr. “Biruca”, “Toinho” e “Curió”, detentores de grande conhecimento empírico

sobre a ecologia dos peixes-boi marinhos na Barra de Mamanguape, com os quais pude contar com total respeito, cordialidade e muita descontração ao longo dos quatro anos de atividades na Unidade Executora do CMA, no Estado da Paraíba;

- Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias, sem os quais não teria conseguido a execução desta pesquisa, em especial a Ana Maria, pela paciência e ajuda incansável;
- Aos amigos Willans, Naama, Charles, Bruno, Victoria, George, Daniele, Staneslaw, por todo apoio, acolhida e descontração durante as inúmeras viagens e tempo de convivência no transcorrer destes últimos anos;
- Ao Departamento de Nutrição da UFPE, pela colaboração durante o processamento das amostras de água, em especial à Prof. Dra. Tânia Lucia Montenegro Stamford e Daniele Soares;
- Ao curso de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE;
- A comunidade da Barra de Mamanguape, em especial a D<sup>a</sup>. Aparecida, “Se”, Jocélio e ao “Zé” por toda a simplicidade, humildade e alegrias compartilhadas neste local tão especial;
- Ao apoio logístico do Fundo Nacional do Meio Ambiente (FNMA), e financeiro da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia (FACEPE), Petrobras, através de patrocínio ao projeto Conservação de Matas Alagadas de Mamirauá;
- Aos todos os peixes-boi, em especial ao “Guape” e “Guaju”, que mesmo por trás de um olhar singelo, sempre transmitiram muita paz e alegria.

No passado, enquanto muitos incentivaram, poucos não acreditaram;

No presente, enquanto muitos compartilham esta conquista, poucos lamentam-se;

Contudo, em todos os instantes agradeço a participação de todos, pois

O incentivo que recebi, foi transformado em grande motivação e os obstáculos que encontrei, foram como desafios, que para vencê-los, precisei ter uma grande determinação.

## RESUMO

O objetivo neste trabalho foi verificar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) e peixes-boi amazônicos (*Trichechus inunguis*) no Brasil, além de avaliar a transmissão hídrica deste coccídeo e a sua influência com os funcionários diretamente envolvidos no manejo dos animais mantidos em cativeiro. Para tanto foram coletadas amostras fecais provenientes de 34 peixes-boi marinhos, 12 peixes-boi amazônicos e 21 funcionários envolvidos em atividades de manejo, bem como amostras de água superficial destinada a manutenção e consumo dos animais. As amostras fecais foram processadas através da sedimentação pelo formol-éter e coradas pela técnica de Kinyoun. No que concerne as amostras de água, estas foram submetidas ao processo de filtração em membranas (47 mm de diâmetro e 3 µm de porosidade) sob pressão negativa. No final das análises, as amostras positivas foram submetidas ao Teste de Imunofluorescência Direta. Os resultados obtidos na microscopia de luz e fluorescência revelaram oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 25% (34/136) e 4,30% (05/115), sendo inerentes respectivamente aos peixes-boi marinhos e amazônicos, 23,80% (10/42) do material proveniente dos funcionários e 66,67% (04/06) das análises de água. Os resultados finais apontam a possibilidade dos peixes-boi marinhos e peixes-boi amazônicos infectarem-se com *Cryptosporidium* spp., e participar da epidemiologia das doenças veiculadas pela água, através da eliminação de oocistos viáveis ao ambiente que podem infectar o homem e um grande número de animais domésticos e silvestres. O controle da frequência de infecções de *Cryptosporidium* spp. nos funcionários diretamente envolvidos no manejo e cuidados dos animais mantidos em cativeiro pode ser um dos caminhos para prevenir a infecção nas espécies de peixes-boi.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to verify the occurrence of oocysts of *Cryptosporidium* spp. in Antillean manatees (*Trichechus manatus*) and Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) from Brazil, and also evaluate the hydric transmission of the coccidium and the influence between this pathogen and the staff involved directly in captive animal care and management. Fecal samples were collected from 34 Antillean manatees, 12 Amazonian manatees and also 21 employees involved in the management activities. Water samples, used to the manatees consumption and management were also collected. The fecal samples were processed by sedimentation in formol-ether and Kinyoun technique. Before the water samples were processed, this was submitted to a filtration process in membrane (diameter of 47 mm, porosity of 3  $\mu$ m) under negative pressure. At the end of the analyzing operations, the positive samples were submitted to the Direct Immunofluorescence Test. The results obtained by light and fluorescence microscopy analysis showed alcohol-acid-resistant structures compatible with oocyst of *Cryptosporidium* spp. in 25% (34/136) and 4,30% (05/115) of the material proceeding from Antillean manatees and Amazonian manatees, respectively; 23,80% (10/42) of the material obtained from the employees; and 66,67% (04/06) of the water samples analyzed. The results showed the possibility of Antillean manatees and Amazonian manatees could become infected with *Cryptosporidium* spp., and participate in the epidemiology of this waterborne disease by eliminate of viable oocyst in water environment wich can infect man and a wide range of domestic and wild animals. The hand of the frequency of *Cryptosporidium* spp. in staff involved directly in captive animal care and management could be the way to prevent the infections the manatee's species.

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 3

Tabela 1. Procedência das amostras fecais dos peixes-boi marinhos e amazônicos	58
Tabela 2. Frequência Absoluta (FA) e Relativa (FR) da infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. em peixes-boi marinhos e amazônicos	59

### Capítulo 4

Tabela 1. Diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> spp. de acordo com o teste utilizado	73
Tabela 2. Valores encontrados de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e resultados das análises físico-química e microbiológicas realizadas nas amostras de água	74

### Capítulo 5

Tabela 1. Frequência absoluta e relativa de peixes-boi marinhos infectados por <i>Cryptosporidium</i> spp. nas diferentes faixas etárias	90
Tabela 2. Frequência de biometrias e infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. em peixes-boi marinhos em reabilitação	92
Tabela 3. Grau de Exposição e Frequência da Infecção nos diferentes enquadramentos profissionais de funcionários envolvidos nas atividades de manejo dos peixes-boi marinhos cativos	93

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução Geral

Figura 1: Peixe-boi amazônico	15
Figura 2: Peixe-boi marinho	15
Figura 3: Distribuição dos peixes-boi marinhos e amazônicos no Brasil	16
Figura 4: Ciclo de vida do <i>Cryptosporidium</i>	19

### Capítulo 1

Figura 1: Identificação do oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. pela técnica de Kinyoun	38
Figura 2: Identificação do oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp pelo DAPI	38

### Capítulo 4

Figura 1: Local de captação de água para abastecimento das piscinas (1); piscina de manutenção permanente (2); piscina de reabilitação (3)	71
--	----

### Capítulo 6

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Cryptosporidium</i> spp.	104
--	-----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	14
1.1 Ordem Sirênia	14
1.2 Ocorrência dos Sirênios no Brasil	14
1.3 Estratégias de Conservação do Peixe-boi no Brasil	16
1.4 Enfermidades Parasitárias	17
1.4.1 Considerações Gerais sobre o <i>Cryptosporidium</i> spp.	18
1.4.1.1 Ciclo Evolutivo	18
1.4.1.2 Aspectos Epidemiológicos	20
1.4.1.3 Sinais Clínicos e Diagnóstico	20
1.4.1.4 Tratamento e Controle	21
1.4.1.5 Riscos para a Saúde Pública	22
1.5 Referências	23
<b>2. OBJETIVOS</b>	34
2.1 Objetivos Específicos	34
<b>Capítulo 1</b>	35
<b>3. <i>Cryptosporidium</i> spp. EM PEIXE-BOI MARINHO</b>	36
<b>(<i>Trichechus manatus</i>): RELATO DE CASO</b>	
3.1 Resumo	36
3.2 Abstract	36
3.3 Introdução	37
3.4 Material e Métodos	37
3.5 Resultados e Discussão	38
3.6 Conclusões	41
3.7 Referências	42
<b>Capítulo 2</b>	46
<b>4. OCURRENCIA DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM MANATÍ AMAZÔNICO</b>	47
<b>(<i>Trichechus inunguis</i>, NATTERER, 1883)</b>	
4.1 Resumen	47
4.2 Abstract	47
4.3 Introducción	48
4.4 Material y Métodos	48
4.5 Resultados y Discusión	49

4.6 Referencias	52
<b>Capítulo 3</b>	55
<b>5. INFECÇÃO POR <i>Cryptosporidium</i> spp. EM PEIXES-BOI MARINHOS</b>	56
<b>(<i>Trichechus manatus</i>) E AMAZÔNICOS (<i>Trichechus inunguis</i>) NO BRASIL</b>	
5.1 Resumo	56
5.2 Abstract	56
5.3 Introdução	57
5.4 Material e Métodos	58
5.4.1 Coleta de Material Biológico	58
5.4.2 Processamento Laboratorial	59
5.5 Resultados	59
5.6 Discussão	60
5.7 Conclusões	62
5.8 Referências	63
<b>Capítulo 4</b>	67
<b>6. OCORRÊNCIA DE OOCISTOS DE <i>Cryptosporidium</i> spp. NA ÁGUA</b>	68
<b>DESTINADA A MANUTENÇÃO DOS PEIXES-BOI MARINHOS</b>	
<b>(<i>Trichechus manatus</i>) EM CATIVEIRO</b>	
6.1 Resumo	68
6.2 Abstract	68
6.3 Introdução	69
6.4 Material e Métodos	70
6.4.1 Coleta de Água para Pesquisa de <i>Cryptosporidium</i>	70
6.4.2 Processamento Laboratorial das Amostras de Água	71
6.4.3 Análise de Parâmetros Físico-Químicos e Microbiológicos	72
6.5 Resultados e Discussão	72
6.6 Conclusões	77
6.7 Referências	78
<b>Capítulo 5</b>	84
<b>7. OCORRÊNCIA DE <i>Cryptosporidium</i> spp. EM PEIXES-BOI MARINHOS</b>	85
<b>(<i>Trichechus manatus</i>) E FUNCIONÁRIOS ENVOLVIDOS NO MANEJO</b>	
<b>DA ESPÉCIE</b>	
7.1Resumo	85

7.2 Abstract	85
7.3 Introdução	86
7.4 Material e Métodos	87
7.4.1 Coleta de Material Biológico	87
7.4.1.1 Animais	87
7.4.1.2 Funcionários	88
7.4.2 Processamento Laboratorial	88
7.4.2.1 Animais	88
7.4.2.2 Funcionários	89
7.4.3 Análise Estatística	89
7.5 Resultados e Discussão	89
7.6 Conclusões	95
7.7 Referências	96
<b>Capítulo 6</b>	100
<b>8. CRIPTOSPORIDIOSE: UMA AMEAÇA A CONSERVAÇÃO DOS MAMÍFEROS AQUÁTICOS NO BRASIL</b>	101
8.1 Resumo	101
8.2 Abstract	101
8.3 Introdução	102
8.4 Agente Etiológico	103
8.5 Ciclo Biológico	103
8.6 Ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em Mamíferos Aquáticos	104
8.7 Transmissão	105
8.8 Sinais Clínicos	106
8.9 Diagnóstico	107
8.10 Tratamento	107
8.11 Medidas de Prevenção e Controle	108
8.12 Repercussão em Saúde Pública	109
8.13 Considerações Finais	110
8.14 Referências	111
<b>9. CONCLUSÕES GERAIS</b>	120

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 A Ordem Sirênia

Os sirênios estão entre os descendentes da linha placentária dos mamíferos, sendo um dos primeiros a se adaptarem inteiramente ao ambiente aquático, representando, hoje em dia, o único grupo de herbívoros aquáticos desta Classe (BEST, 1982). Apresentam vida longa, baixa taxa reprodutiva e encontram-se distribuídos em mais de 90 países (REYNOLDS e ODELL, 1991), porém apresentam o menor número de indivíduos entre todas as ordens de mamíferos, sendo estimado cerca de apenas 130.000 animais no mundo.

Esta ordem compreende duas famílias, a Dugongidae que esta representada por duas espécies, a *Hydrodamalis gigas*, conhecida como vaca marinha de Steller, extinta pelo homem em 1768, e a *Dugong dugon*, o dugongo. Este último é semelhante ao peixe-boi na aparência, mas apresentam uma diferenciação bem visível na nadadeira caudal, que é parecida com a de golfinho e baleia (MARSH et al., 1986), além da presença de dentes incisivos em machos adultos e o rostro curvado ventralmente (EISENBERG, 1981). Estes são os únicos sirênios estritamente de águas marinhas, ocorrendo em pântanos da região tropical e subtropical e águas costeiras de ilhas dos oceanos Índico e Pacífico (MARSH e LEFEBVRE, 1994; DOMNING, 1996; BERTA e SUMICH, 1999).

A outra família é a Trichechidae, com três espécies conhecidas, sendo: *Trichechus senegalensis* (peixe-boi africano), *Trichechus inunguis* (peixe-boi amazônico) e *Trichechus manatus* (peixe-boi marinho) (HUSAR, 1977; REYNOLDS e ODELL, 1991; VIANNA et al., 2006).

### 1.2 Ocorrência dos Sirênios no Brasil

No Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (2001), ocorrem duas das quatro espécies de sirênios: o peixe-boi amazônico e o peixe-boi marinho (Figuras 1 e 2), onde a partir de uma revisão documental, Whitehead (1978) percebeu que os primeiros registros destas espécies datam de 1500, com o relato de um autor anônimo pertencente à expedição de Cabral.



Figura 1: Peixe-boi amazônico/ Fonte: Ciência Hoje



Figura 2: Peixe-boi marinho/ Fonte: Projeto Sirenia

Isolado da espécie marinha, provavelmente devido à orogenia Andina ocorrida no Mioceno (época da criação do lago temporário Amazônico), o peixe-boi amazônico ocupou lagos e rios da Bacia Amazônica (MARMONTEL et al., 1992), desde as cabeceiras dos rios na Colômbia, Peru e Equador até a Ilha de Marajó, na região estuarina (BEST, 1984; DOMNING e HAYEK, 1986).

Com relação ao peixe-boi marinho, historicamente este estava distribuído desde o Estado do Espírito Santo (WHITEHEAD, 1978) até o Amapá (DOMNING, 1981; BEST e TEIXEIRA, 1982), porém após extenso levantamento realizado na costa brasileira, foi constatado o seu desaparecimento no litoral do Espírito Santo, Bahia e Sergipe (ALBUQUERQUE e MARCOVALDI, 1982; LIMA et al., 1992), sendo a atual distribuição descontínua entre os Estados de Alagoas e Amapá (LIMA, 1997; LUNA, 2001) (Figura 3).

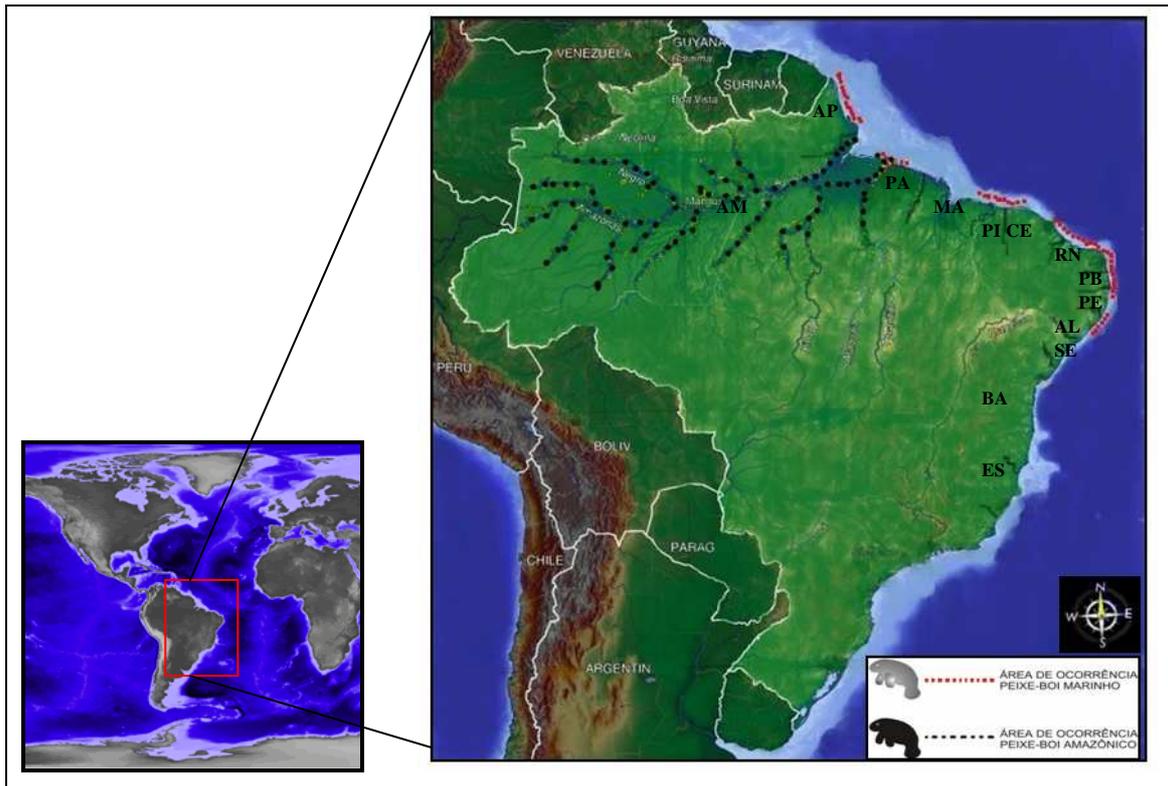


Figura 3: Distribuição dos peixes-boi marinhos e amazônicos no Brasil

### 1. 3 Estratégias de Conservação do Peixe-boi no Brasil

A partir de uma detalhada revisão bibliográfica inerente ao histórico dos peixes-boi marinhos e amazônicos no Brasil, Luna (2001) ressaltou que ambas as espécies foram exploradas desde o período da colonização, através da caça tradicional e predatória (exploratória), em quantidades que chegavam a carregar mais de 20 navios todos os anos, sendo utilizado a carne, couro e a gordura. Esta forte pressão de caça permaneceu até o século XX, ocorrendo alta mortalidade de peixes-boi marinhos e amazônicos (BEST, 1982; DOMNING, 1982).

A caça do peixe-boi amazônico persiste ainda nos tempos atuais, porém em menor escala (BOROBIA, 1991; COLARES, 2002), no entanto, com o início dos trabalhos conservacionistas, a caça intencional dos peixes-boi marinhos reduziu significativamente (LIMA, 1997) e nos últimos anos, no nordeste não têm sido identificados novos casos.

Além da caça indiscriminada, a morte acidental em redes de pesca (OLIVEIRA et al., 1994), a intensa degradação do habitat, o assoreamento dos estuários, a intensificação do trânsito de embarcações (PARENTE et al., 2004), a construção de hidrelétricas (ROSAS, 1994), o aumento do número de encalhe de filhotes no litoral

nordestino (LIMA, 1997) e sua reprodução lenta, acarretou na redução do número de indivíduos (ROSAS, 1994; LIMA, 1997; LUNA, 2001).

Tais fatores resultaram na inclusão tanto do peixe-boi amazônico como do peixe-boi marinho na Lista Oficial de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (BRASIL, 1989), e do Apêndice I da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção, CITES (2000). Encontram-se na categoria de “vulnerável” à extinção na classificação da IUCN “The World Conservation Union” (2006), ou seja, apresentam alto risco de extinção na natureza em médio prazo. Porém, no Plano de Ação para Mamíferos Aquáticos do Brasil (IBAMA, 2001), o peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) é citado como uma espécie em perigo crítico de extinção, ou seja, corre risco extremamente alto de extinção na natureza em futuro imediato.

#### 1.4 Enfermidades Parasitárias

Além dos fatores mencionados, que ameaçam a conservação dos peixes-boi no Brasil, a presença de determinados agentes patogênicos como bactérias (VERGARA-PARENTE et al., 2003), vírus (BRACHT et al., 2006) e parasitos (BORGES et al., 2005), podem acarretar no comprometimento da sanidade dos animais ou ainda resultar em morte.

Diversos agentes parasitários têm sido relatados na literatura acometendo os peixes-boi, sendo descrita a infecção por trematóides (BOEVER et al., 1977; DAILEY et al., 1988; BECK e FORRESTER, 1998; MULLINS et al., 2003), nematóides (MIGNUCCI-GIANNONI et al., 1999) e cestóides (BECK e FORRESTER, 1998), além de transtornos ocasionados por coccídios, a exemplo de *Eimeria manatus* (LAINSON et al., 1983), *Toxoplasma gondii* (BUERGELT e BONDE, 1983) e *Cryptosporidium* spp. (MARCONDES et al., 2002).

A ocorrência do *Cryptosporidium* spp. acometendo estes animais, despertou para um maior esforço de investigação, pois se não obstante a sua resistência a condições de ambiente, este coccídio pode ser facilmente veiculado através dos mananciais aquáticos e vir a infectar outros espécimes, tanto em cativeiro como em vida livre, e ainda ao homem.

#### 1.4.1 Considerações Gerais sobre o *Cryptosporidium* spp.

A classificação sistemática do gênero *Cryptosporidium*, foi apresentada por Levine (1984) e Rose (1990), conforme segue abaixo:

Filo: Apicomplexa

Classe: Sporozoasida

Subclasse: Coccidiasina

Ordem: Eucoccidiorida

Subordem: Eimeriorina

Família: Cryptosporidiidae

Gênero: *Cryptosporidium*

Atualmente são reconhecidas 13 espécies, a saber: *C. muris*, *C. andersoni*, *C. parvum*, *C. hominis*, *C. wrairi*, *C. felis* e *C. canis* acometendo os mamíferos; *C. baileyi*, *C. meleagridis* e *C. galli* em aves; *C. serpentis* e *C. saurophilum* em répteis e *C. molnari* em peixes (XIAO et al., 2004). Este protozoário foi descrito inicialmente em 1907 por Tyzzer, sendo o organismo isolado da mucosa gástrica de ratos de laboratório assintomáticos e denominado *Cryptosporidium muris*. Em 1910, este mesmo pesquisador propôs que o *Cryptosporidium* compunha um novo gênero e *Cryptosporidium muris* uma espécie, além de ter identificado o *Cryptosporidium parvum*, após dois anos (FAYER, 1997).

Considerado um parasito comensal por muito tempo, poucas pesquisas foram desenvolvidas voltadas ao *Cryptosporidium* spp., porém após o surto com mortalidades em aves domésticas (SALVIN, 1955), a associação com quadros de diarreia bovina (ROSE, 1990; ANDRADE NETO e ASSEF, 1996) e a co-infecção em hospedeiros imunocomprometidos, despertou o interesse no estudo deste protozoário patogênico que até então, não tinha grandes repercussões na ciência.

##### 1.4.1.1 Ciclo Evolutivo

No ciclo de vida do *Cryptosporidium*, os oocistos são excretados nas fezes de um hospedeiro infectado e a fase endógena começa após estes serem ingeridos por um hospedeiro susceptível. Em decorrência de fatores como a temperatura corporal, enzimas proteolíticas e sais biliares ocorre o rompimento da parede dos oocistos no intestino delgado, possibilitando a liberação dos esporozoítos (SMITH e ROSE, 1998).

Estes penetram nas microvilosidades da célula epitelial do intestino delgado, formando um vacúolo parasitóforo, envolvido por membranas de células hospedeiras e do próprio parasito (CURRENT e HAYNES, 1983).

Os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos e a multiplicação assexuada chamada de merogonia resulta na formação de dois tipos de merontes, o tipo I e tipo II, que liberam oito e quatro merozoítos respectivamente. Somente merozoítos de merontes tipo II iniciam o ciclo sexuado (gametogonia), onde os merozoítos diferenciam-se em microgametócitos ou macrogametócitos (SMITH e ROSE, 1998).

Cada macrogametócito é fertilizado por um microgameta, onde o produto da fertilização, o zigoto, desenvolve-se dentro de um oocisto, sofrendo meiose e originando quatro esporozoítos (esporogonia). De acordo com Smith e Rose (1998), os oocistos são liberados no lúmen do intestino e excretados nas fezes, podendo infectar outro hospedeiro susceptível, reiniciando o ciclo ou podem ainda, causar autoinfecção no mesmo hospedeiro infectado (Figura 4).

Smith (1993) citou que há dois tipos de oocistos, aqueles de paredes espessas excretados nas fezes e resistentes às condições ambientais, responsáveis pela transmissão da infecção entre hospedeiros; e aqueles de parede delgada que se rompem no hospedeiro e liberam esporozoítos que invadem células epiteliais, responsáveis por autoinfecções. Desta maneira, não ocorre a necessidade de hospedeiros intermediários (LALLO, 1996).

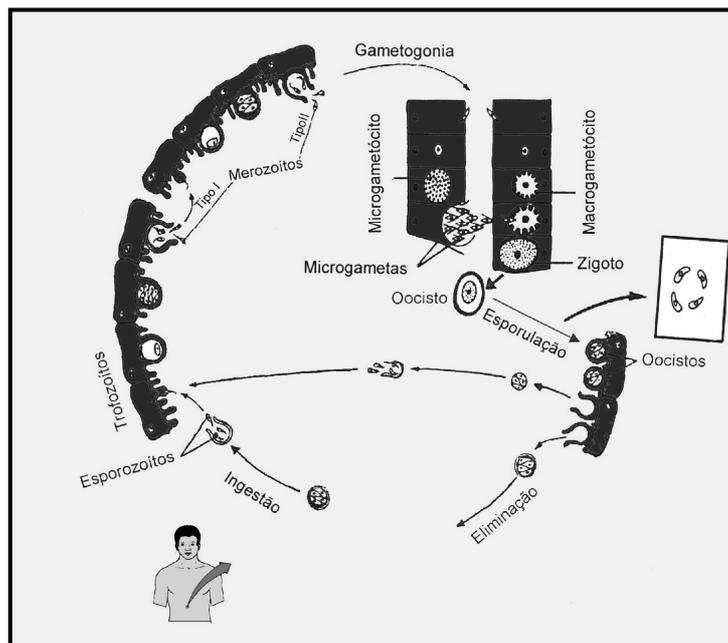


Figura 4: Ciclo de vida do *Cryptosporidium*/ Fonte: SMITH & ROSE, 1998

#### 1.4.1.2 Aspectos Epidemiológicos

Considerada uma doença de distribuição mundial (UNGAR, 1995), o *Cryptosporidium* spp. vem merecendo lugar de destaque entre os principais enteropatógenos (ROSE, 1990), conforme observado na população humana (DIAS et al., 1988; MAGALHÃES et al., 1990; MANGINI et al., 1992; GUARDIS, 1998; BARALDI et al., 1999) e em diversas espécies de animais como bovinos (CALDASSO et al., 1999), suínos (MARTINS et al., 1993), eqüinos (SILVA et al., 1996), aves domesticas (MEIRELES e FIGUEIREIDO, 1992), felinos (LUCAS e HAGIWARA, 1997), caninos (LALLO e BONDAN, 2006), pequenos mamíferos silvestres (DALL'OLIO e FRANCO, 2004) e mamíferos aquáticos (HUGHES-HANKS et al., 2005; BORGES et al., 2006).

A abrangência entre as diversas espécies acometidas é favorecida, em alguns casos, pela ausência da especificidade de hospedeiros (FAYER et al., 2004), de maneira a possibilitar a transmissão dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. entre humanos, animais para humanos e vice-versa, através da rota fecal-oral, a partir de águas superficiais ou de reservatório (SMITH, 1993) e alimentos contaminados (MONGE & ARIAS, 1996; FAYER et al., 2000).

Segundo Carey et al. (2004), os oocistos de *Cryptosporidium* apresentam grande resistência. Esta afirmação é evidenciada por outros autores ao certificar a capacidade dos oocistos deste coccídio permanecer viáveis por vários meses em condições ambientais, sujeitos às oscilações de temperatura, salinidade (FAYER et al., 2000) e ainda suportar a ação dos desinfetantes comumente utilizados (CAUSER et al., 2006).

#### 1.4.1.3 Sinais Clínicos e Diagnóstico

De acordo com as constatações de Smith e Rose (1998), a intensidade da doença varia de acordo com a dose infectante, entretanto, foi relatado que a ingestão de apenas um oocisto de *Cryptosporidium* pode levar à infecção (WATANABE, 1996).

Em diversos animais, incluindo o homem, a susceptibilidade à infecção assim como a severidade e duração da mesma variam consideravelmente entre indivíduos, dependendo ainda do “status” imunológico, do estado nutricional e exposição prévia, sendo que em indivíduos imunocompetentes a doença tem caráter benigno com o desaparecimento dos sinais clínicos em poucos dias ou semanas e naqueles imunodeprimidos a infecção pode se tornar crônica e ser fatal (UNGAR, 1995; LALLO, 1996).

Sinais clínicos como a diarreia aquosa, anorexia, perda de peso, dores abdominais e desidratação são alguns dos transtornos observados em mamíferos (LALLO, 1996), sendo que nos animais aquáticos, além destes foram relatados os deslocamentos lentos e aumento do intervalo respiratório (BORGES et al., 2005).

Em algumas espécies de mamíferos terrestres, foi descrito que o ciclo biológico rápido e auto-infectivo do *Cryptosporidium* podem levar ao grande número de células parasitadas no intestino delgado ocasionando infecções secundárias no duodeno e intestino grosso, sendo constatado ainda, em indivíduos imunocomprometidos o parasita no estômago, ducto biliar e pancreático, bem como no trato respiratório (BUTLER e MAYFIELD, 1996).

A complexidade da criptosporidiose como doença clínica, faz com que esta não possa ser clinicamente distinguida de outros agentes gastroentéricos, portanto técnicas específicas de diagnóstico são comumente utilizadas, a partir do exame de fezes para a detecção dos oocistos (ANDRADE NETO e ASSEF, 1996).

Segundo Laberge et al. (1996), os oocistos podem ser visualizados em amostras fecais através da microscopia óptica, contraste de fase e eletrônica ou por utilização de vários corantes histoquímicos como o Giemsa, Ziehl-Nielsen, Kinyoun, safranina-azul de metileno, dimetil sulfóxido, pelo método de Koster modificado (KAGERUKA et al., 1984), os corantes fluorescentes como auramina-rodamina, auramina-carbolfuccina (LABERGE et al., 1996), auramina-fenol (TAYLOR e WEBSTER, 1998) e o corante vital 4'-6'-diamidino-2-phenilindole, DAPI (SMITH et al., 2002).

No intuito de aumentar a confiabilidade dos resultados, outras técnicas estão sendo utilizadas, tais como o teste de imunofluorescência direta ou indireta com anticorpos poli ou monoclonais (STIBBS e ONGERTH, 1986; HERNANDEZ et al., 1994), além da Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) (MORGAN et al., 2000).

#### 1.4.1.4 Tratamento e Controle

Atualmente diversos fármacos estão sendo exaustivamente testados no tratamento da criptosporidiose (SPRINZ et al., 1998; ARMSON et al., 2002; COULLIETTE et al., 2006), porém até o momento não existem terapias e vacinas eficazes, sendo recomendada a adoção de protocolos voltados para os sinais clínicos presentes, incluindo a reposição hidroeletrólítica, suporte nutricional e fármacos antidiarreicos, antimicrobianos e imunoterápicos (CAREY et al., 2004).

Aliado às dificuldades encontradas no tratamento de hospedeiros com a criptosporidiose, o controle dos oocistos em mananciais aquáticos vem sendo considerado uma preocupação de âmbito mundial (TSUSHIMA et al., 2003; FAYER et al., 2004), com repercussão também no Brasil (MULLER, 1999; GOMES et al., 2002; MACHADO, 2006), pois as características inerentes ao tamanho e resistência dos oocistos e ainda as limitações empregadas no tratamento de água favorecem a sua disseminação (CAUSER et al., 2006).

Conforme sugerido por Gomes et al. (2002), o controle do *Cryptosporidium* nos recursos hídricos deve estar relacionado à preservação e manutenção dos mananciais e ao saneamento básico, sendo incorporado ainda como medidas preventivas deste agente, o monitoramento constante nos filtros utilizados em estações de tratamento e piscinas, a adoção de métodos capazes de promover a inativação dos oocistos, como o ozônio e sistema ultravioleta (KANJO et al., 2000; CAUSER et al., 2006), além dos cuidados com a higiene pessoal (FAYER, 1997).

#### 1.4.1.5 Riscos para a Saúde Pública

Considerada uma parasitose emergente (GRIFFITHS, 1998; AMBROISE-THOMAS, 2000), com o aumento significativo de sua incidência nas últimas décadas (LUCAS e HAGIWARA, 1997; BARRADAS, 1999), a criptosporidiose vem representando um risco direto para a saúde pública, haja visto o seu caráter zoonótico de transmissão (FAYER, 1997; CAREY et al., 2004).

A transmissão do agente proveniente dos animais ao homem foi documentada em vários casos, sendo este fator favorecido pelo número de espécies de mamíferos descritas como reservatórios do *Cryptosporidium* spp. (LUCAS e HAGIWARA, 1997; DALL'OLIO e FRANCO, 2004; LALLO e BONDAM, 2006), inclusive dugongos (MORGAN et al., 2000), peixes-boi marinhos e amazônicos (BORGES et al., 2006).

A abrangência de hospedeiros susceptíveis, contribui para a alta disseminação dos oocistos ao ambiente, contaminando posteriormente uma ampla variedade de itens alimentares (SLIFKO et al., 2000) e recursos hídricos, incluindo piscinas, rios, lagos, áreas costeiras e ainda água utilizada para o consumo humano (LeCHEVALLIER e NORTON, 1995; FAYER et al., 2000; FAYER et al., 2004), podendo desencadear surtos expressivos (MACKENZIE et al., 1994).

## 1.5 Referências

ALBUQUERQUE, C.; MARCOVALDI, G. M. Ocorrência e distribuição do peixe-boi marinho no litoral brasileiro (SIRENIA, Trichechidae, *Trichechus manatus*, Linnaeus, 1758). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE A UTILIZAÇÃO DE ECOSISTEMAS COSTEIROS: Planejamento, Poluição e Produtividade. **Resumos**. Rio Grande, p. 27, 1982.

AMBROISE-THOMAS, P. Emerging parasite zoonoses: the role of host-parasite relationship. **International Journal for Parasitology**, Oxford, n. 30, p. 1361-1367, 2000.

ANDRADE NETO, J. L.; ASSEF, M. C. V. Criptosporidiose e microsporidiose. **Tratado de Infectologia**. Veronesi, R. p. 1170-1172, 1996.

ARMSON, A. et al. Efficacy of oryzalin and associated histological changes in *Cryptosporidium*-infected neonatal rats. **Parasitology**, New York, v. 125, p. 113-117, 2002.

BARALDI, S. R.; MARQUES, E. G. L.; DIAS, R. M. D. S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na região de Campinas, SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 97-103, 1999.

BARRADAS, R. C. B. O desafio das doenças emergentes e a revalorização da epidemiologia descritiva. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, DF, v. 8, n. 1, p. 7-15, 1999.

BECK, C.; FORRESTER, D. J. Helminths of the Florida Manatee, *Trichechus manatus latirostris*, with a discussion and summary of the Parasites of Sirenians. **Journal of Parasitology**, Laurence, v.74, n. 4, p. 628-637, 1998.

BERTA, A.; SUMICH, J. L. **Marine Mammals: evolutionary biology**. Academic Press, 1999, 494 p.

BEST, R. C. Seasonal breeding in the Amazonian manatee (Mammalia: Sirenia). **Biotropica**, Washington, n. 14, p. 76-78, 1982.

BEST, R. C. The Aquatic Mammals and Reptiles of the Amazon. In: SIOLI, H (Ed.). x The Amazon. **Limnology and Landscape Ecology of a mighty Tropical River and its Basin**. Boston. In: W. Junk Publishers, 1984, p. 370-412.

BEST, R. C.; TEIXEIRA, D. M. Notas sobre a distribuição e “status” aparente dos peixes-bois (Mammalia: Sirenia) nas costas amapenses brasileiras. **Boletim Informativo da Fundação Brasileira para Conservação da Natureza**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 41-47, 1982.

BOEVER, W. J.; SHILLER, J.; KANE, K.K. *Chiorchis* spp. Trematodiasis in a Natterer's manatee (*Trichechus inunguis*). **Journal of Zoo Animal Medicine**, Laurence, p. 5-6. 1977.

BORGES, J. C. G. et al. *Cryptosporidium* spp. em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) cativo no Centro Mamíferos Aquáticos, Ilha de Itamaracá, no estado de Pernambuco. In: CONGRESSO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA, 1, Guarapari, **Resumos**, 2005.

BORGES, J. C. G. et al. Infecção por *Cryptosporidium* spp.: uma ameaça à conservação dos peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus manatus*) e amazônicos (*Trichechus inunguis*). In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE NA AMAZÔNIA E AMÉRICA LATINA, 7, Ilhéus, **Resumos**, 2006.

BOROBIA, M. Manatees still commercially exploited in Brazil. **Sirenews**, Newsletter of the IUCN/SSC. Sirenia Specialist Group, St. Petersburg, n. 15, 1991.

BRACHT, A. J. et al. Genetic identification of novel poxviruses of cetaceans and pinnipedes. **Archives of Virology**, New York, n. 151, p. 423-438, 2006.

BRASIL. IBAMA. **Portaria Nº 1.522, de 19 de dezembro de 1989**. Lei Nº 7.735 de 22 de fevereiro de 1989. Resolve reconhecer como Lista Oficial de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br>. Acesso em: 10 jan 2007. 1989.

BUERGELT, C. D.; BONDE, R. K. Toxoplasmic meningoencephalitis in a West Indian manatee. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 183, p. 1294-1296, 1983.

BUTLER, B. J.; MAYFIELD, C. I. *Cryptosporidium* spp. – A review of the organism, the disease, and implications for managing water resources. Waterloo. **Centre for Groundwater Research Waterloo**, Ontario, 1996.

CALDASSO, C. C. et al. Biodinâmica de oocistos de *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer, 1912) em fezes de bovino de corte, no município de Cristal, RS. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 27, n. 1, 1999.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, New York, v. 38, p. 818-862, 2004.

CAUSER, L. M. et al. An outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection at an Illinois recreational waterpark. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 134, n. 01, p. 147-156, 2006.

CITES. **Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagem em Perigo de Extinção**. Apêndice I. 2000, Disponível em: <http://www.wcmc.org.br/cites>. Acesso em: 15 jun 2004.

COLARES, F. A. P. **Estudo de Modelos não Lineares de Crescimento em Peixe-Boi Marinho *Trichechus manatus manatus* e Peixe-Boi Amazônico *Trichechus inunguis***

(MAMMALIA: SIRENIA) em Cativeiro. 2002. 63 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COULLIETTE, A. D. et al. *Cryptosporidium parvum*: treatment effects and the rate of decline in oocyst infectivity. **Journal Parasitology**, Kan, v. 92, n. 1, p. 58-62, 2006.

CURRENT, W. L.; HAYNES, T. B. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. **The New England Journal Medicine**, Waltham, n. 308, p. 1252-1257, 1983.

DALL'OLIO, A. J.; FRANCO, R. M. B. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em pequenos mamíferos silvestres de três áreas serranas do Sudeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 25-31, 2004.

DAILEY, M. D.; VOGELBEIN, W.; FORRESTER, D. J. *Moniligerum blairi* n. g., n. sp. and *Nudacotyle undicola* n. sp. (Trematoda: Digenea) from the West Indian Manatee, *Trichechus manatus* L. **Systematic Parasitology**, Dordrecht, v. 11, p. 159-163, 1988.

DIAS, R. M. et al. Cryptosporidiosis among patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in the country of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, n. 30, p. 310-312, 1998.

DOMNING, D. P. Distribution and status of manatees *Trichechus* spp. In Brazil c 1785-1973. **Biological Conservation**, Essese, v. 22, p. 85-97, 1981.

DOMNING, D. P. Comercial exploitation of manatees *Trichechus* in Brazil c. 1785-1973. **Biological Conservation**, Essese, v. 22, p. 101-126, 1982.

DOMNING, D. P. **Bibliography and index of the sirenia and desmotilylia**. Smithsonian Contributions to Paleobiology. Washington, D. C: Smithsonian Intitution Press, 1996, n. 80, 611 p.

DOMNING, D. P.; HAYEK, L. A. C. Interespecific and intraespecific morphological variation in manatees (SIRENIA: *Trichechus*) **Marine Mammals Science**, Lawrence, v.2, n. 2, p. 87-144, 1986.

EISENBERG, J. F. The Mammalian radiations: An Analysis of Trends in Evolution, **Adaptation and Behavior**, 70 p., 1981.

FAYER, R. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Boca Raton: CRC Press, p. 251, 1997.

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 11, p. 531-536, 2004.

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

GOMES, A. H. S. et al. Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em águas de fontes naturais e comparação com análises bacteriológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 61, n. 1, p. 59-63, 2002.

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

GUARDIS, M. Cryptosporidiosis. In: SAREDI, N.; BAVA, J. Cryptosporidiosis in pediatric patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 197-200, 1998.

HERNANDEZ, J. R.; BLASC, A. C.; SANCHEZ, A. M. M. Epidemiology and diagnosis of *Cryptosporidium* spp. parasitism in children usefulness of the serological study. **Revista Clinica Espanola**, Madrid, n. 194, p. 330-333, 1994.

HUGHES-HANKS, J. M. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. In Five Marine Species. **Journal of Parasitology**, Kan, v. 91, n. 5, p. 1255-1228, 2005.

HUSAR, S. L. *Trichechus inunguis*. **Mammalia Species**, n. 72, p. 1-4, 1977.

HUSAR, S. L. *Trichechus manatus*. **Mammalia Species**, n. 93, p. 1-5, 1978.

IBAMA. **Mamíferos aquáticos do Brasil**: Plano de ação. Versão 2, Brasília, DF, 2001. 61p.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. 2006. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 19 nov 2006.

KAGERUKA, P. et al. Modified Koster staining method for the diagnosis of cryptosporidiosis. **American Society Belge of Medicine Tropical**, v. 64, p. 171-175, 1984.

KANJO, Y. Inactivation of *Cryptosporidium* spp. Oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by in vitro excystation and animal infectivity. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 41, p. 119-125, 2000.

LABERGE, I. et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* in raw milk by PCR and oligonucleotide probe hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 62, n. 9, p. 3259-3264, 1996.

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

LALLO, M. A.; BONDAN, E. F. Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães de Instituições da cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 120-125, 2006.

LAINSON, D.; NAIFF, R. D.; BEST, R. C.; SHAW, J. J. *Eimeria trichechi* n. sp. From the Amazonian manatee, *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia). **Systematic Parasitology**, Dardrecht, v. 5. p. 287-289. 1983.

LeCHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D. Giardia and Cryptosporidium spp. In raw and finished drinking water. **Journal American Water Works Association**, New York, v.87, p. 54-68, 1995.

LEVINE, N. D. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* spp. (Protozoa, Apicomplexa). **Journal of Protozoology**, México, v. 31, p. 94-98, 1984.

LIMA, R. P. **Peixe-Boi Marinho (*Trichechus manatus*): Distribuição, status de conservação e aspectos tradicionais ao longo do litoral nordeste do Brasil**. 1997, 80f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LIMA, R. P. et al. Levantamento da distribuição, ocorrência e status de conservação do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*, Linnaeus, 1758) no litoral nordeste do Brasil. Peixe-Boi: **Coletânea de Trabalhos de Conservação e Pesquisa de Sirênios no Brasil**. MMA/IBAMA, v. 1, n. 1, p. 47-72, 1992.

LUCAS, S. R. R.; HAGIWARA, M. K. Infecção por *Cryptosporidium* em gatos na cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 19, n. 1, 1997.

LUNA, F. O. **Distribuição, status de conservação e aspectos tradicionais do Peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) no litoral norte do Brasil**. 2001. 121 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MACHADO, E. C. L. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife/PE**. 2006. 141 f. Tese (Doutorado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MACKENZIE, W. R. et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, n. 331, p. 161-167, 1994.

MAGALHÃES, M. et al. Microbiologia da diarreia aguda endêmica em crianças do Recife. **Revista do Instituto Materno Infantil**, Recife, v. 4, n. 1, p. 23-28, 1990.

MANGINI, A. C. et al. *Cryptosporidium* parasitism in children with acute diarrhea. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, n. 34, p. 341-345, 1992.

MARCONDES, M. C. C. et al. *Cryptosporidium* sp in Antillean Manatees (*Trichechus manatus manatus*) in natural captivity, Paraíba state, Brazil. **Florida Marine Mammal Health Conference**, Gainesville. Disponível: <[www.vetmed.utl.edu](http://www.vetmed.utl.edu)>. Acesso em 29 jul 2002, 2002.

MARMONTEL, M.; ODELL, D. K.; REYNOLDS III, J. E. Reproductive biology of South American manatees. In: HAMLETT, W. C. (Ed). **Reproductive Biology of South American Vertebrates**. New York: Springer-Verlag, 1992, p. 295-311.

MARTINS, J. R. et al. Associação de *Cryptosporidium* spp. encontrados em suínos recentemente desmamados. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 21, p. 32-36, 1993.

MARSH, H.; LEFEBVRE, L. W. Sirenian status and conservation efforts. **Aquatic Mammals**, v. 20, n. 3, p. 155-170, 1994.

MARSH, H.; O'SHEA, T. J.; BEST, R. C. Research on Sirenians. **AMBIO. A Journal of the Human Environment**, Stoholm, v. 15, n. 3, p. 177-180, 1986.

MEIRELES, M. V.; FIGUEIREIDO, P. C. Isolamento e Identificação do *Cryptosporidium baileyi*, 1986 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 12, p. 125-130, 1992.

MIGNUCCI-GIANNONI, A. A.; WILLIAMS JR, E. H.; TOYOS-GONZÁLES, G. M. Helminths from a stranded manatee in the Dominican Republic. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam, v. 81, n 1, p. 69, 1999.

MONGE, L.; ARIAS, M. L. Presencia de microorganismos patógenos em hortaliças de consumo cru em Costa Rica. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 46, n. 4, p. 292-294, 1996.

MORGAN, U. M. et al. Detection of the *Cryptosporidium parvum* "Human" Genotype in a Dugong (*Dugong dugon*). **Journal Parasitology**, Kan, v. 86, p. 1352-1354, 2000.

MULLER, A. N. B. **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo**. 1999. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência). Universidade de São Paulo.

MULLINS, M. C. et al. Trematoda da família Opisthotrematidae parasito de *Trichechus inunguis* (Sirenia: Trichechidae) em Balbina no Estado do Amazonas, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 18, 2003, Rio de Janeiro. **Resumos**. p. 215. 2003.

OLIVEIRA, E. M. A. et al. Mortalidade do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) na costa Nordeste do Brasil. In: REUNIÓN DE TRABAJO DE ESPECIALISTAS EN MAMÍFEROS ACUATICOS DA AMÉRICA DEL SUR, 4. **Resúmenes**, Valdivia, p. 191-196, 1994.

PARENTE, C. L.; VERGARA-PARENTE, J. E.; LIMA, R. P. Strandings of Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*) in northeastern Brazil. **The Latin American Journal of Aquatic Mammals**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 69-76, 2004.

REYNOLDS, J. E.; ODELL, D. K. **Manatees and Dugongs**. Facts on file. Inc. New York. 1991, 192 p.

ROSAS, F. C. W. Biology, conservation and status of the Amazonian Manatee *Trichechus inunguis*. **Mammal Review**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 49-59, 1994.

ROSE, J. B. Occurrence and Control of *Cryptosporidium* in Drinking Water. **Drinking Water Microbiology**, New York, p. 294-321, 1990.

SALVIN, D. *Cryptosporidium* spp. meleagridis (sp. Nov.). **Journal Comparative Pathology**, Edinburg, v. 65, p. 262-266, 1955.

SILVA, N. R. S. et al. Infecção mista por *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium muris* em equinos de Porto Alegre, RS, Brasil. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 24, n. 1, 1996.

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

SMITH, J. L. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* as Agents of Foodborne Disease. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 56, n. 5, p. 451-461, 1993.

SMITH, H. V. et al. Significance of Enhanced Morphological Detection of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in Water Concentrates Determined by Using 4',6'-Diamidino-2-Phenylindole and Immunofluorescence Microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 5198-5201, 2002.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne Cryptosporidiosis: Current status. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 14, p. 14-22, 1998.

SPRINZ, E. et al. AIDS – related Cryptosporidial diarrhoea: an open study with roxithromycin. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. London, v. 41, p. 85-91, 1998, Supplement B.

STIBBS, H. H.; ONGERTH, J. E. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, n. 24, p. 517-521, 1986.

TAYLOR, M. A.; WEBSTER, K. A. Recent advances in the diagnosis in livestock of *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Giardia* and other protozoa of veterinary importance. **Research in Veterinary Science**, New York, v. 65, p. 183-193, 1998.

TSUSHIMA, Y. Viability and Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts detected in river water in Hokkaido, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**. Tokyo, v. 65, n. 5, p. 585-589, 2003.

UNGAR, B. L. P. *Cryptosporidium*. In: **Principles and Practice of Infectious Disease**. 4 ed. MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. Churchill Livingstone, p. 2500-2510, 1995.

VERGARA-PARENTE, J. E. et al. Salmonellosis in an Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) calf: a fatal case. **Aquatic Mammals**, Scotland, v. 29, n. 1, p. 131-136, 2003.

VIANNA, J. A. et al. Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichecid sirenians: implications for manatee conservation. **Molecular Ecology**, v.15, n. 2, p. 433-447, 2006.

WATANABE, M. New *Cryptosporidium* Testing Methods. **Environmental Science & Technology**, Washington, n. 30, p. 532-535, 1996.

WHITEHEAD, P. J. P. Registros antigos da presença do peixe-boi do Caribe (*Trichechus manatus*) no Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 8, n. 3, p. 497-506, 1978.

XIAO, L. et al. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.

## 2. OBJETIVOS

Estudar a ocorrência do *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) e peixes-boi amazônicos (*Trichechus inunguis*) no Brasil.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Identificar a frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos e amazônicos;
- Avaliar a possibilidade de veiculação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. através da água destinada aos peixes-boi marinhos cativos;
- Avaliar a relação entre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) e nos funcionários envolvidos na manutenção destes animais em cativeiro;
- Revisar os fatores epidemiológicos relacionados à infecção por *Cryptosporidium* spp. em mamíferos aquáticos.

## **CAPÍTULO 1**

***Cryptosporidium* spp. EM PEIXE-BOI MARINHO  
(*Trichechus manatus*): RELATO DE CASO**

### **3. *Cryptosporidium* spp. EM PEIXE-BOI MARINHO (*Trichechus manatus*):**

#### **RELATO DE CASO**

##### **3.1 Resumo**

A criptosporidiose constitui-se como uma zoonose que pode afetar o homem e uma ampla variedade de animais domésticos e silvestres, principalmente indivíduos imunodeficientes. Objetivou-se com este trabalho relatar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em peixe-boi marinho. Após ser constatado a mudança de comportamento de um peixe-boi marinho mantido nos oceanários do Centro Mamíferos Aquáticos/IBAMA-FMA, este foi submetido a exame clínico e, posteriormente a coleta de amostra fecal. A amostra fecal foi analisada pela técnica de Kinyoun, teste de imunofluorescência direta e pelo corante 4',6'-Diamidino-2-Phenilindole (DAPI). No exame clínico, o animal apresentou sinais de desconforto abdominal. Os resultados obtidos nas análises de microscopia de luz e fluorescente revelaram a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Este é o primeiro relato deste coccídio acometendo peixe-boi marinho mantido em oceanário.

Palavras-Chave: Criptosporidiose, zoonose, mamíferos aquáticos, sirênios

##### **3.2 Abstract**

Cryptosporidiosis is a zoonosis which can affect man and a wide range of domestic and wild animals mainly immunodeficient individuals. This paper was with object to relate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Antillean manatee. After an unusual behavior of an Antillean manatee kept in captivity at the Centro Mamíferos Aquáticos/IBAMA-FMA, clinical examination and posterior fecal sampling was performed. The fecal samples was analysed by the Kinyoun techniques, Direct Immunofluorescence Test and also examined by 4' 6'-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) staining. At the clinical examination, the animal showed signs of abdominal pain. The results obtained by light and fluorescence microscopy analysis showed the occurrence of oocyst of *Cryptosporidium* spp. This is the first report of coccidium affecting Antillean manatee kept in captivity.

Key words: Cryptosporidiosis, zoonosis, aquatic mammals, sirenians

### 3.3 Introdução

Os peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) são mamíferos aquáticos de hábitos exclusivamente herbívoros que freqüentam áreas costeiras brasileiras e estuarinas, sendo distribuídos de forma descontínua entre os estados de Alagoas e Pará (LIMA, 1997; LUNA, 2001).

Entre os agentes parasitários relacionados a infecções em Sirênios pode-se destacar o *Cryptosporidium* spp. em dugongos, *Dugong dugon* (HILL et al., 1997) e em peixe-boi marinho mantido em ambiente natural (MARCONDES et al., 2002). Além destes, a ocorrência de *Cryptosporidium* sp. foi relatada em animais domésticos, silvestres, répteis, peixes, e o homem (LALLO, 1996, GRACZYK e CRANFIELD, 2000; ALVAREZ-POLLITERO e SITJÀ-BOBADILLA, 2002; COX et al., 2005).

Segundo Wiebbelling et al. (2002), frequentemente esta enfermidade encontra-se relacionada com hospedeiros imunodeficientes, podendo ocasionar diarreia aguda, dor abdominal, náuseas, vômitos, anorexia e a depender da severidade do quadro pode resultar em morte. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. possuem a capacidade de resistir aos desinfetantes comumente utilizados, permanecendo no ambiente durante semanas ou meses, inclusive em diferentes temperaturas e salinidades (FAYER et al., 2004), contribuindo assim para a sua rápida dispersão.

Desta maneira, diante da ocorrência do *Cryptosporidium* spp. em diferentes espécies de mamíferos aquáticos (DENG et al., 2000; HUGLES-HANKS et al., 2005; SANTÍM et al., 2005) e frente a possibilidade da infecção nos peixes-boi marinhos, o efetivo diagnóstico deste agente torna-se de fundamental importância, no intuito de serem estabelecidas medidas preventivas, visto que esta espécie de mamífero aquático encontra-se seriamente ameaçada de extinção (IBAMA, 2001).

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de relatar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) mantido em oceanário, no Estado de Pernambuco, Brasil.

### 3.4 Material e Métodos

Entre os animais cativos nos oceanários do Centro Mamíferos Aquáticos/IBAMA-FMA, localizado na Ilha de Itamaracá (7°44'52"Sul; 34°49'32"Oeste), Estado de Pernambuco – Brasil, foi coletada amostra fecal de um peixe-boi marinho macho, com 14 anos de idade, 340 quilogramas (Kg) e 296

centímetros (cm) de comprimento total. No momento do exame clínico, o animal apresentou desconforto abdominal, aumento do intervalo respiratório e letargia, sendo administrado o tratamento de suporte a base de óleo mineral (por via oral) e antibioticoterapia por via intramuscular (Pentabiótico veterinário pequeno porte 600.000 U).

O material fecal foi encaminhado ao Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Brasil, sendo em seguida submetido à sedimentação pelo formol-éter com posterior confecção dos esfregaços e coloração através da técnica de Kinyoun (BRASIL, 1996), ao teste de imunofluorescência direta (Merifluor - Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio) e ao corante 4'.6'-Diamidino-2-Phenilindole (DAPI).

### 3.5 Resultados e Discussão

Foram identificados 40 oocistos de *Cryptosporidium* spp. por grama de fezes, pela técnica de Kinyoun (Figura 1), sendo o diagnóstico confirmado pelos testes de imunofluorescência direta e DAPI (Figura 2).

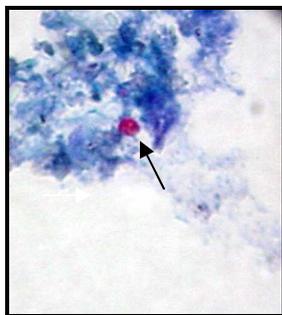


Figura 1: Identificação de oocisto de *Cryptosporidium* spp. pela técnica de Kinyoun

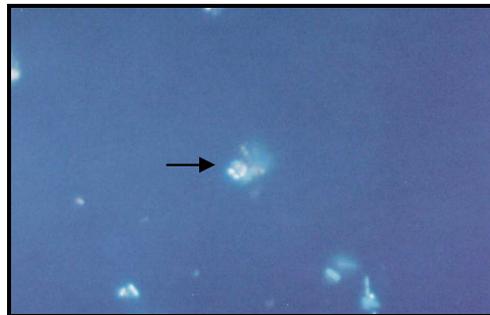


Figura 2: Identificação de oocisto de *Cryptosporidium* spp. pelo DAPI

Após a administração do tratamento de suporte, o animal foi monitorado, sendo constatado o desaparecimento dos sinais clínicos apresentados com aproximadamente 48 horas. Desta forma, as manifestações clínicas apresentadas pelo animal examinado podem ser sugestivas de transtornos ocasionados por *Cryptosporidium* spp., ou ainda a sua ação conjunta com outros patógenos, sendo destacado que o desaparecimento destes, podem ter sido decorrentes à ação da conduta terapêutica empregada ou ainda devido ao seu caráter autolimitante (LEVINE et al., 1988; LALLO, 1996).

Os sinais clínicos observados neste espécime foram semelhantes aos descritos por Hill et al. (1997) em dugongo com anorexia e acentuada letargia, além de natação lenta em águas rasas, no qual foi identificado a presença maciça de *Cryptosporidium* nas microvilosidades do intestino delgado.

O diagnóstico da infecção por *Cryptosporidium* spp. neste estudo, foi favorecido pela associação dos sinais clínicos apresentados pelo animal e a utilização de três técnicas distintas de exames laboratoriais, as quais vêm comumente sendo realizadas em outras pesquisas, inclusive envolvendo outras espécies de mamíferos aquáticos (WEBSTER et al., 1996; DENG et al., 2000; HUGHES-HANKS et al., 2005; SANTÍM et al., 2005).

Vale salientar, que o peixe-boi avaliado encontrava-se mantido com outros oito espécimes em uma estrutura de três oceanários. Atualmente, a captação de água destes recintos provem de águas marinhas costeiras e de um poço artesiano situado nas imediações das instalações, a qual é submetida ao tratamento diário à base de cloro e após o processo de sedimentação das partículas em suspensão estes são filtrados e aspirados. Entre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados sistematicamente, encontram-se a salinidade, pH, temperatura, turbidez, cloro residual, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, coliformes fecais e coliformes totais.

Mesmo diante dos cuidados no tratamento de água destes oceanários, tendo em vista a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. já relatada em diversos mananciais aquáticos (JOHNSON et al., 1995; SMITH e GRIMASON, 2003; TSUSHIMA et al., 2003; HELLER et al., 2004), surge como uma preocupação eminente no que concerne à veiculação hídrica deste agente, pois de acordo com Carey et al. (2004), a ineficiência dos métodos de tratamento de água permite a sua disseminação por este meio, devido à resistência aos desinfetantes comumente empregados e às limitações das técnicas de filtração, em decorrência ao pequeno tamanho dos oocistos (LeCHEVALLIER et al., 1991; SMITH, 1998; CAUSER et al., 2006).

Avaliando ainda outros fatores que podem ter proporcionado a veiculação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. ao peixe-boi infectado, destaca-se o contato com pessoas durante as ocasiões de manejo, visto o seu caráter zoonótico de transmissão (FAYER, 2004).

Além destes fatores apresentados, Smith (1993) destacou os alimentos como importante via de transmissão deste coccídio. Os itens alimentares constituintes da dieta dos peixes-boi cativos, no Centro Mamíferos Aquáticos/IBAMA-FMA, são coletados na costa litorânea da Ilha de Itamaracá, nos bancos de fundo arenosos e nos arrecifes, sendo ofertadas algas (*Caulerpa* sp, *Halimeda opuntia*, *Penicillus capitatus*, *Dictyota* sp, *Sargassum* sp), o capim-agulha (*Halodule wrightii*) e verduras (CARDOSO e PIKANÇO, 1998). Sendo assim, a oferta destes alimentos podem estar incriminados entre os fatores de risco de disseminação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., haja visto, que este coccídeo já foi descrito em alfaces, rabanetes, tomates, pepinos e cenouras (MONGE e CHINCHILLA, 1996; ORTEGA et al., 1997).

### **3.6 Conclusões**

Esta é a primeira ocorrência de *Cryptosporidium* spp. acometendo os peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) mantidos em oceanários;

A presença do animal infectado com outros peixes-bois cativos pode favorecer a disseminação da criptosporidiose, o que torna oportuno a realização de exames laboratoriais em todos os animais cativos, com ou sem sinais clínicos;

Este fato representa riscos para a saúde pública, haja visto a rotina de manejo dos peixes-boi cativos executadas pela equipe técnica e tratadores.

### 3.7 Referências

ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÀ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 1007-1021, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Infecções oportunistas por parasitas em AIDS: técnicas de diagnóstico**. Brasília, DF, 1996, 27 p.

CARDOSO, E.; PICANÇO, M. Descrição da Alimentação Natural Fornecida aos Peixes-Boi (*Trichechus manatus manatus*, LINNAEUS, 1758) em Cativeiro do Centro Peixe-Boi – Itamaracá-PE. In: REUNIÃO DE TRABALHO DE ESPECIALISTAS EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS DA AMÉRICA DO SUL, 8. CONGRESSO DA SOCIEDADE LATINOAMERICANA DE ESPECIALISTAS EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS, 2. **Resumos**, Olinda, p. 41, 1998.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS. J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, Washington, v. 38, p. 818-862, 2004.

CAUSER, L. M. et al. An outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection at an Illinois recreational waterpark. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 134, p. 147-156, 2006.

COX, M. J. et al. Age-specific seroprevalence to an immunodominant *Cryptosporidium* sporozoite antigen in a Brazilian population. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 133, p. 951-956, 2005.

DENG, M.; PETERSON, R. P.; CLIVER, D. O. First findings of *Cryptosporidium* and *Giardia* in California sea lions (*Zalophus californianus*). **Journal of Parasitology**, Kan, v. 86, p. 490-494, 2000.

FAYER, R. *Cryptosporium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam. p. 1-20, 2004.

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 11, p. 531-536, 2004.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. *Cryptosporidium serpentis* Oocysts and Microsporidian Spores in Feces of Captive Snakes. **Journal Parasitology**, Kan, v. 86, n. 2., p. 413-414, 2000.

HILL, B. D.; FRASER, I. R.; PRIOR, H. C. *Cryptosporidium* infection in a dugong (*Dugong dugon*). **Australian Veterinary Journal**, Brunswich, v. 75, n. 9, p. 670-671, 1997.

HELLER, L. et al. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos a saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 13, n. 11, p. 79-92, 2004.

HUGHES-HANKS, J. M. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. In Five Marine Species. **Journal of Parasitology**, Kan, v. 91, n. 5, p. 1255-1228, 2005.

IBAMA. **Mamíferos Aquáticos do Brasil**: Plano de Ação. 2. ed. Brasília, 2001, 102 p.

JOHNSON, D. C. et al. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. **Water Science Technology**, Oxford, n. 31. p. 439-442, 1995.

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

LeCHEVALLIER, M. W.; NORTON, N. D.; LEE, R. G. Ocurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 9, p. 2610-2616, 1991.

LEVINI, J. F. et al. Cryptosporidiosis in veterinary students. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 193, n. 11, p. 1413-1414, 1988.

LIMA, R. P. **Peixe-Boi Marinho (*Trichechus manatus manatus*): Distribuição, status de conservação e aspectos tradicionais do litoral nordeste do Brasil**. 1997. 80f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LUNA, F. O. **Distribuição, status de conservação e aspectos tradicionais do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) no litoral norte do Brasil**. 2001. 122 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MARCONDES, M. C. C. et al. *Cryptosporidium* sp in Antillean Manatees (*Trichechus manatus manatus*) in natural captivity, Paraíba state, Brazil. **Florida Marine Mammal Health Conference**, Gainesville. Disponível em: [www.vetmed.utl.edu](http://www.vetmed.utl.edu), Acesso em 29 jul 2002, 2002.

MONGE, R.; CHINCHILA, M. Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59. p. 202-203, 1996.

ORTEGA, Y. R. et al. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 57, n. 6, p. 683-686, 1997.

SANTÍN, M.; DIXON, B. R.; FAYER, R. Genetic Characterization of *Cryptosporidium* Isolates From Ringed Seals (*Phoca hispida*) in Northern Québec, Canada. **Journal of Parasitology**, Kan, v. 91, n. 3, p. 712-716, 2005.

SMITH, H. V. Detection of parasites in the environment. **Parasitology**. New York, n. 117. p. 113-141, 1998.

SMITH, H. V.; GRIMASON, A. M. *Giardia* and *Cryptosporidium*. In: **The Handbook of Water and Wastewater Microbiology**. Academic Press, p. 696-755, 2003.

SMITH, J. L. *Cryptosporidium* and *Giardia* as agents of foodborne disease. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 56. n. 5, p. 451-461, 1993.

TSUSHIMA, Y. et al. Viability and Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts detected in river water in Hokkaido, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 65, n. 5, p. 585-589, 2003.

WEBSTER, K. A. et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in faeces: comparison of conventional coproscopical methods and the polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 61, p. 5-13, 1996.

WIEBBELLING, A. M. P. et al. Avaliação do conhecimento sobre criptosporidiose em uma amostra de médicos de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 1-7, 2002.

## **CAPÍTULO 2**

**OCURRENCIA DE *Cryptosporidium* spp. EN MANATÍ  
AMAZÓNICO (*Trichechus inunguis*, NATTERER, 1883)**

## 4. OCURRENCIA DE *Cryptosporidium* spp. EN MANATÍ AMAZÓNICO (*Trichechus inunguis*, Natterer, 1883)

### 4.1 Resumen

El parásito apicomplexa *Cryptosporidium* infecta algunos mamíferos, incluyendo especies terrestres y acuáticas. En la epidemiología de esta enfermedad, el agua y el alimento podrían ser el modo principal de transmisión para animales susceptibles. Entre los Sirénidos, la ocurrencia de *Cryptosporidium* spp se informó en dugongos (*Dugong dugon*) y manatíes antillano (*Trichechus manatus manatus*). Este trabajo tiene como objetivo describir la ocurrencia de *Cryptosporidium* spp. en manatíes amazónicos. Se recogieron 115 muestras fecales de manatíes amazónicos (*Trichechus inunguis*), cautivos y en libertad, y se sometieron a la técnica de Kinyon para determinar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Después de analizadas, las muestras positivas fueron sometidas a confirmación mediante el Test de Inmunofluorescencia Directa. Los resultados mostraron que 4,34% (5/115) de las muestras fueron positivas. La ocurrencia de este parásito en el manatí amazónico puede ser suficiente para incrementar la diseminación asociada a infecciones transmitidas por el agua, en manatíes y en humanos. Este es el primer informe de *Cryptosporidium* spp en manatí amazónico.

**Palabras-Clave:** Sirénidos, coccidio, agua, Amazonia

### 4.2 Abstract

The apicomplexan parasite *Cryptosporidium* infects some mammals, including terrestrial and aquatic species. In the epidemiology of these diseases, the water and food can be the main source of infection to susceptible animals. Among the Sirenians, the occurrence of this coccidium has been reported in dugongs (*Dugong dugon*) and Antillean manatee (*Trichechus manatus*). This paper was with object to relate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Amazonian manatee. 115 fecal samples were collected from captive and free-ranging Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*), and processed by Kinyon technique for the presence of *Cryptosporidium* spp. At the end of the analyzing operations, the positive samples were submitted to the Direct Immunofluorescence Test. The results showed 4,34% (05/115) of positive

samples. The occurrence of this parasite in Amazonian manatee could be sufficient to increase the outbreaks associated of waterborne infections in manatee and also in humans. This is the first report of *Cryptosporidium* spp. in the Amazonian manatee.

**Key Word:** Sirenians, coccidium, water, Amazonia

### 4.3 Introducción

El manatí amazónico (*Trichechus inunguis*) habita en el río Amazonas y sus afluentes, inclusive en la desembocadura en el Atlántico y en las inmediaciones de la Isla del Marajó (LUNA et al., 2002), encontrándose en la categoría “vulnerable” por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (2006).

Diversas investigaciones vienen siendo realizadas para la conservación de estos animales. De esta manera, las enfermedades parasitarias asumen un importante papel en la manutención de estos especímenes en la naturaleza. Entre estos agentes destaca el *Cryptosporidium* spp., que ha sido descrito en dugongo, *Dugong dugon* (HILL et al., 1997) y manatí antillano, *Trichechus manatus manatus* (MARCONDES et al., 2002; BORGES et al., 2005).

A pesar de varios informes implicando la transmisión de este protozooario en ambiente acuático, la vía directa o indirecta, particularmente a través de agua contaminada por materia fecal, ha sido observada en las focas de la Groenlandia (*Pagophilus groenlandicus*) infectadas con *Cryptosporidium parvum* (FAYER y LINDSAY, 2004).

De esta forma, la diseminación de la infección entre mamíferos acuáticos puede ser facilitada por factores relacionados con la intensidad de la contaminación ambiental y la sobrevivencia de los oocistos a las condiciones del medio (ROBERTSON et al., 1992; TSUSHIMA et al., 2003; CAREY et al., 2004).

Dependiendo de las especies afectadas, se han observado signos clínicos como pérdida de peso, diarrea, molestia abdominal y letargo en manatí antillano (MARCONDES et al., 2002; BORGES, et al., 2005), además de la muerte en dugongo con infección natural por *Cryptosporidium* spp. (HILL et al., 1997).

Este trabajo tiene como objetivo describir la ocurrencia de *Cryptosporidium* spp. en manatíes amazónicos (*Trichechus inunguis*) mantenidos cautivos y en ambiente natural.

#### **4.4 Material y Métodos**

La recogida de las muestras fecales se llevó a cabo durante las expediciones realizadas en la época vaciante del lago Amanã (02°26'34" Sur y 064°47'24" Oeste), en agosto de 2005 y en la época creciente (noviembre y diciembre de 2005) en actividades de marcación con radio-trasmisores en manatíes nativos, en la Reserva de Desenvolvimento Sustentável Amanã-RDSA, en la Amazonía Occidental Brasileña y durante las biometrías de los manatíes amazónicos mantenidos en cautiverio en el Conselho Nacional de Seringueiros –CNS durante el mismo año en Alter do Chão (01°57'16" Sur y 54°44'22.9" Oeste), en el Estado de Pará, Brasil.

Las muestras fecales fueron obtenidas directamente de diez animales nativos y dos mantenidos cautivos durante las actividades de manipulación, además de 103 muestras fecales sobrenadantes encontradas en las incursiones realizadas en el lago Amanã. Por ocasión de la biometría, todos los animales fueron sometidos a una evaluación clínica previa, siendo observados, después de la recogida de heces, el color, el olor y la consistencia del material fecal.

Todo el material recogido fue acondicionado en frascos, debidamente identificados, conteniendo una solución de alcohol, formol, ácido acético glacial y agua destilada (AFA) y llevado al Laboratorio de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Las muestras fueron analizadas por duplicado, a través de sedimentación por el formol-éter con posterior preparación de los barridos y coloración a través de la técnica de Kinyoun (BRASIL, 1996), para la identificación de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Las muestras positivas fueron sometidas al test de inmunofluorescencia directa (STIBBS y ONGERTH, 1986).

#### **4.5 Resultados y discusión**

Fueron observadas ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en el 1,74% (02/115) y 2,60% (03/115) del material proveniente de manatíes nativos y de las muestras fecales sobrenadantes, respectivamente, totalizando el 4,34% (05/115) de muestras positivas.

Mediante los resultados obtenidos, se puede constatar la presencia de *Cryptosporidium* spp., en ambiente acuático amazónico. La criptosporidiosis en Sirénidos ha sido informada a través de exámenes parasitológicos en manatíes antillanos, *Trichechus manatus manatus* (MARCONDES et al., 2002; BORGES, et al.,

2005) del litoral del nordeste brasileño e histopatológicos en dugongos, *Dugong dugon* en la región costera de Queensland, Australia (HILL et al., 1997). En lo que concierne a otras especies de mamíferos acuáticos, la infección por este coccidio fue diagnosticada en leones-marinos de California, *Zalophus californianus* (DENG et al., 2000), foca ocelada (*Phoca hispida*), ballena de Groenlandia (*Balaena mysticetus*) y ballena-franca del norte, *Eubalaena glacialis* (HUGHES-HANKS et al., 2005).

Los estudios realizados anteriormente informando de la presencia de *Cryptosporidium* spp. en mamíferos acuáticos, demostraron que la infección por este coccidio se encontraba más crítica entre poblaciones de ballena-franca del norte, foca ocelada e ballena de Groenlandia, las cuales presentaron una prevalencia del 24,5%, 22,6% y 5,1%, respectivamente (HUGHES-HANKS et al., 2005).

La evaluación clínica de los animales reveló la presencia de un cuadro diarreico sólo en una cría mantenida cautiva. Los demás animales no presentaron ninguna manifestación clínica y las muestras presentaron consistencia, color y olor característico de la especie. Las muestras analizadas fueron obtenidas de forma casual, no siendo direccionada para animales con cuadros diarreicos o que presentasen cualquier signo clínico sugestivo de criptosporidiosis, según algunos estudios realizados con otras especies de mamíferos (GARCIA y LIMA, 1994; GARLIPP et al., 1995). Siendo así, factores como la edad de los animales estudiados, contaminación de los manantiales acuáticos, pueden ser responsables del reducido número de muestras positivas de este estudio.

Según lo informado por Queiroz (2006), aún existe una cierta integridad de los recursos ambientales en la Reserva de Desenvolvimento Sustentável Amanã; por otro lado, las limitaciones sanitarias de las comunidades, liberación de desechos en los ríos por los barcos de la región, además de aquellos de origen animal que fluyen para los igarapés y lagos, observados durante la recogida de material, pueden haber sido responsables de la contaminación del ambiente acuático y consecuentemente la infección de los animales.

De esta manera, la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. provenientes de animales infectados en estos recursos hídricos aumenta la preocupación con el ciclo de transmisión entre los Sirénidos, particularmente, manatíes amazónicos, además de la posibilidad de transmisión para el hombre tanto en momentos de recreo, como en el inadecuado consumo de agua por las poblaciones ribereñas, según lo sugerido por Baraldi et al. (1999) y Moura et al. (2006).

Este es el primer informe de *Cryptosporidium* spp. afectando al manatí amazónico (*Trichechus inunguis*) y su constatación constituye una manera indirecta de evaluar la calidad de los recursos hídricos y su implicación en la salud pública.

#### 4.6 Referencias

BARALDI, S. R.; MARQUES, E. G. L.; DIAS, R. M. D. S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na região de Campinas/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 97-103, 1999.

BORGES, J. C. G. et al. *Cryptosporidium* spp em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) cativo no Centro Mamíferos Aquáticos, Ilha de Itamaracá, no estado de Pernambuco. In: CONGRESSO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA, 1. **Resumos**, Guarapari, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Infecções oportunistas por parasitas em AIDS: técnicas de diagnóstico**, 1996, 27 p.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, n. 38, p. 818-862, 2004.

DENG, M.; PETERSON, R. P.; CLIVER, D. O. First findings of *Cryptosporidium* and *Giardia* in California sea lions (*Zalophus californianus*). **Journal of Parasitology**, Kan, v. 86, p. 490-494, 2000.

FAYER, R.; LINDSAY, D. Zoonotic protozoa in the marine environment: a threat to aquatic mammals and public health. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n.125, p. 131–135, 2004.

GARCIA, A. M.; LIMA, D. Prevalência de *Cryptosporidium* spp em rebanhos leiteiros de Pará de Minas (MG) e sua relação com praticas de manejo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 23-28, 1994.

GARLIPP, C. R.; BOTTINI, P. V.; TEIXEIRA, A. T. L. S. A prevalência de diagnósticos laboratoriais de criptosporidioses humanas e outros coccídeos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 37, n..5, p. 467-469, 1995.

HILL, B. D.; FRASER, I. R.; PRIOR, H. C. *Cryptosporidium* infection in a dugong (*Dugong dugon*). **Australia Veterinary Journal**, Brunswich, v. 75, n. 9, p. 670-671, 1997.

HUGHES-HANKS, J. M. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. In Five Marine Species. **Journal of Parasitology**, Kan, v. 91, n. 5, p. 1255-1228, 2005.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. 2006. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 19 nov 2006.

LUNA, F. O. et al. Distribuição do Peixe-Boi Amazônico (*Trichechus inunguis*) no Estado do Amazonas, Brasil. In: REUNIÓN DE TRABAJO DE ESPECIALISTAS EM MAMÍFEROS ACUÁTICOS DE AMÉRICA DEL SUR, 10 Y CONGRESO DE LA SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE ESPECIALISTAS EN MAMÍFEROS ACUÁTICOS, 4; **Resumos**, Valdivia, p. 99, 2002.

MARCONDES, M. C. C. et al. *Cryptosporidium* sp in Antillean Manatees (*Trichechus manatus manatus*) in natural captivity, Paraíba state, Brazil. **Florida Marine Mammal Health Conference**, Gainesville, 2002. Disponível em: <<http://www.vetmed.utl.edu>>, Acesso em: 29 jul 2002.

MOURA, E. A. F. et al. Água de beber, água de tomar banho: diversidades sociais do consumo da água pelos moradores da várzea de Mamirauá. Disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br>>. Acesso 10 jun 2006.

QUEIROZ, H. Aspectos Ecológicos da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Amanã. Disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br>>. Acesso 10 jun 2006.

ROBERTSON, L. J.; CAMPBELL, A. T.; SMITH, H. V. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 58, p. 3494-3500, 1992.

STIBBS, H. H.; ONGERTH, J. E. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, n. 24, p. 517-521, 1986.

TSUSHIMA, Y. et al. Viability and Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts detected in river water in Hokkaido, Japan. **The Journal Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 65, n. 5, p. 585-589, 2003.

## **CAPÍTULO 3**

**INFECCÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM PEIXES-BOI  
MARINHOS (*Trichechus manatus*) E AMAZÔNICOS  
(*Trichechus inunguis*) NO BRASIL**

## **5. INFECÇÃO POR *Cryptosporidium* spp. EM PEIXES-BOI MARINHOS (*Trichechus manatus*) E AMAZÔNICOS (*Trichechus inunguis*) NO BRASIL**

### **5.1 Resumo**

Infecções por *Cryptosporidium* spp. surge como preocupação entre os mamíferos aquáticos, em virtude da transmissão hídrica dos oocistos. Objetivou-se com este trabalho relatar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) e amazônicos (*Trichechus inunguis*) no Brasil. Para tanto, foram coletadas amostras fecais e processadas pela técnica de Kinyoun, sendo as amostras positivas submetidas ao teste de imunofluorescência direta. Os resultados evidenciaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 12,5% (17/136) do material proveniente dos peixes-boi marinhos e 4,3% (05/115) das amostras analisadas de peixes-boi amazônicos. Infecção por *Cryptosporidium* spp. foi mais prevalente em animais cativos do que em populações de vida livre.

Palavras-Chave: Coccídio, diagnóstico, mamíferos aquáticos, sirênios, zoonose

### **5.2 Abstract**

Infections by *Cryptosporidium* spp. are a major concern among aquatic mammals because the hydric transmission of the oocysts. The object of the present study was to relate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Antillean manatee (*Trichechus manatus*) and Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) from Brazil. Fecal samples were collected and processed by the Kinyoun technique. At the end of the analyzing operations, the positive samples were submitted to the Direct Immunoflorescence Test. The results showed the presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in 12,5% (17/136) of the material obtained from the Antillean manatees and in 4,3% (05/115) of the samples from the Amazonian manatees. *Cryptosporidium* spp. infection was more prevalent in the captivity animals than those from free-ranging populations.

Keywords: Coccidian, diagnosis, aquatic mammals, sirenians, zoonosis

### 5.3 Introdução

Entre as diversas espécies de mamíferos aquáticos com comprometimento de suas populações, o peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*) e o peixe-boi amazônico (*Trichechus inunguis*) encontram-se na categoria “Vulnerável” na classificação da “The World Conservation Union” (IUCN, 2006), e no Brasil, segundo o Plano de Ação para Mamíferos Aquáticos, a espécie marinha esta classificada como “Em perigo crítico”, e a amazônica em “Vulnerável” (IBAMA, 2001). Estas categorias são decorrentes de diversos fatores antrópicos, que representam riscos diretos para estas espécies, como a perda do habitat, desmatamento, poluição, caça predatória (MARCH et al., 1986) captura em redes de pesca e o encalhe de filhotes (LIMA et al., 1992; PARENTE et al., 2004).

Mesmo considerado um mamífero aquático resistente a doenças (WHITE e FRANCIS-FLOYD, 1990), o peixe-boi, apresenta-se susceptível a infecção por diversos agentes com potencial zoonótico (BUCK e SCHROEDER, 1990). Neste sentido, o *Cryptosporidium* spp. foi diagnosticado em dugongos, *Dugong dugon* (HILL et al, 1997) e peixe-boi marinho, *Trichechus manatus manatus* (MARCONDES et al., 2002; BORGES et al., 2005), sendo observado sinais clínicos como a perda de peso, diarreia, desconforto abdominal, letargia, além de morte em dugongos com infecção natural por este coccídio (MORGAN et al., 2000).

De acordo com FAYER et al. (2004), a água e os alimentos contaminados constituem as principais formas de disseminação da infecção. Desta maneira, diante de fatores predisponentes como a oferta de determinados itens alimentares aos animais cativos, as manifestações clínicas já observadas, a relevância no que diz respeito à saúde pública, a disseminação e resistência do agente as condições ambientais, aliado ao reduzido número de informações inerentes a ocorrência deste coccídio em peixes-boi marinhos e amazônicos, torna-se oportuno a realização de uma pesquisa direcionada a estas espécies.

Neste trabalho objetivou-se relatar a infecção por *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos e amazônicos no Brasil.

## 5.4 Material e Métodos

### 5.4.1 Coleta de Material Biológico

O material coletado foi proveniente de 34 peixes-boi marinhos, sendo machos e fêmeas, na faixa etária de filhotes a adultos, onde 28 destes estavam mantidos em piscinas, dois em cativeiro no ambiente natural e quatro em vida livre (após reintrodução), respectivamente nos Estados de Pernambuco, Paraíba e entre Sergipe e Rio Grande do Norte. Para cada animal foram coletadas quatro amostras fecais na ocasião da biometria, em intervalos de 60 dias.

Com relação à espécie amazônica, foram coletadas amostras provenientes de 12 animais, de ambos os sexos e faixa etária de filhotes a adultos, sendo dois destes mantidos em piscinas e dez em vida livre (animais nativos), além de 103 amostras fecais sobrenadantes encontradas durante as incursões no lago Amanã, respectivamente nos Estados do Pará e Amazonas. Em decorrência as dificuldades de acesso a estes espécimes, apenas uma amostra de cada indivíduo foi obtida (Tabela 1).

Por ocasião da biometria, todos os peixes-boi manejados foram submetidos a uma avaliação clínica prévia, onde além dos fatores inerentes ao estado geral dos animais verificaram-se os aspectos relacionados a cor, odor e consistência do material fecal.

Tabela 1. Procedência das amostras fecais dos peixes-boi marinhos e amazônicos

Procedência	Peixe-boi marinho		Peixe-boi amazônico	
	Número de animais	Número de amostras	Número de animais	Número de amostras
Piscinas	28	112	2	2
Cativ. em amb. natural	2	8	-	-
Vida livre	4	16	10	10
Amostras sobrenadante	-	-	-	103
Total	34	136	12	115

Após a coleta, o material foi acondicionado em frascos contendo solução constituída de álcool, formol, ácido acético glacial e água destilada (AFA), em proporções sugeridas por Ueno e Gonçalves (1994) devidamente identificados e encaminhados ao Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco-Brasil.

#### 5.4.2 Processamento Laboratorial

O material coletado foi submetido à sedimentação pelo formol-éter com posterior confecção dos esfregaços e coloração através da técnica de Kinyoun (BRASIL, 1996), para a identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. Posteriormente, as amostras positivas foram submetidas ao teste de imunofluorescência direta (STERLING e ARROWOOD, 1986).

Para o cálculo do número médio de oocistos por ml da amostra (X) utilizou-se a fórmula recomendada por Cantusio Neto e Franco (2004).

#### 5.5 Resultados

Foram observadas oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 25% (34/136) do material proveniente dos peixes-boi marinhos, correspondendo a 50% (17/34) dos animais. Com relação aos peixes-boi amazônicos, as amostras positivas corresponderam em 4,3% (05/115) do material analisado, onde 1,7% (02/115) foram obtidas de indivíduos capturados e 2,6% (03/115) do material fecal sobrenadante. Sendo assim, observou-se uma maior frequência do coccídio na espécie marinha (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência Absoluta (FA) e Relativa (FR) da infecção por *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos e amazônicos

Procedência da Amostra	Peixe-boi marinho		Peixe-boi amazônico	
	FA	FR (%)	FA	FR (%)
Piscinas	13	76,4	-	-
Cativeiro Amb. Natural	2	11,8	-	-
Vida Livre	2	11,8	2	40
Amostras Sobrenadante	-	-	3	60
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>100</b>

FA: Frequência absoluta

FR: Frequência relativa

Os números de oocistos encontrados nas amostras fecais variaram de 40-120 por grama de fezes, nas duas espécies, porém em uma amostra de peixe-boi marinho mantido em cativeiro no ambiente natural foram encontrados 280 oocistos por grama de fezes.

Entre os peixes-boi marinhos avaliados e que apresentaram diagnóstico positivo, aproximadamente 76,47 % (13/17) apresentaram sinais clínicos compatíveis com a ação do agente. As manifestações verificadas consistiram em quadros de diarreias, desconforto abdominal, aumento do intervalo respiratório, letargia, deslocamentos lentos e emagrecimento, porém nem sempre todos estavam presentes em um mesmo animal. Das amostras positivas dos peixes-boi amazônicos, não foi possível avaliar estes sinais, devido à ausência de monitoramento, visto tratar-se de indivíduos nativos.

## 5.6 Discussão

Diante dos resultados encontrados, pode-se constatar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos e amazônicos, sendo a maior intensidade da infecção observada na espécie marinha. Entre os meios de disseminação do parasito, a contaminação hídrica dos ambientes costeiros foi incriminada como uma das possíveis formas que favorece a transmissão dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. (LeCHEVALLIER et al., 1991; FAYER et al., 2002; GOMES et al., 2002; LUNA et al., 2002; LIMA e STAMFORD, 2003; HELLER et al., 2004).

Segundo Robertson et al. (1992), oocistos de *Cryptosporidium* spp. apresentam grande resistência em condições ambientais, incluindo os ambientes costeiros (FREIRE-SANTOS et al., 1999, FAYER et al., 2002) e estuários (FERGUNSON et al., 1996), sendo estes locais considerados habitats dos peixes-boi marinhos (LIMA, 1997; PALUDO, 1998), o que pode ter contribuído para a infecção dos animais mantidos em cativeiro no ambiente natural e em vida livre.

O baixo número de amostras infectadas provenientes dos peixes-boi amazônicos pode estar relacionado a uma menor contaminação dos recursos hídricos, conforme o observado por Queiroz (2006), onde aponta certa integridade e proteção da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Amanã, porém as limitações sanitárias das comunidades, a liberação de dejetos fecais nos rios pelos barcos da região e os dejetos dos animais escoados para os igarapés e lagos são importantes fontes de contaminação dos mananciais aquáticos e, portanto passíveis de disseminação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Além destes fatores ambientais, outro ponto importante que pode ter influenciado na intensidade de infecção dos peixes-boi amazônicos, diz respeito a impossibilidade de ter sido coletado um maior número de amostras fecais de um mesmo

animal em períodos distintos, conforme método empregado nos peixes-boi marinhos, haja visto que, em determinadas situações, o número de oocistos liberados pode ser reduzido, diante da recuperação do animal a infecção (FAYER et al., 2004), dificultando assim o seu diagnóstico.

Com base nos resultados, ao ser avaliado as duas espécies, o maior número de diagnóstico foi observado nos animais cativos. Este achado sugere que além da possibilidade da veiculação hídrica, outros fatores podem estar associados na disseminação do coccídio, como a oferta dos diferentes itens alimentares (capim-agulha, algas-marinhas, cenoura, beterraba, alface e eventualmente frutas e aguapés), a manipulação dos alimentos por tratadores (HOSKIN e WRIGHT, 1991; MONGE e AIRAS, 1996; ORTEGA et al., 1997), a interação constante entre os animais cativos, sobretudo o comportamento de coprofagia (HARTMAN, 1979), podendo influenciar a infecção (PIANTA, 1993).

As constatações dos sinais clínicos ocorreram apenas na espécie marinha, sendo que dos 17 animais com diagnóstico positivo, alterações como desconforto abdominal, quadros de diarreia, aumento do intervalo respiratório e deslocamentos lentos estavam presentes em 76,47% (13/17) dos espécimes. Na ausência de investigação clínica detalhada, de maneira a verificar a ocorrência de outros patógenos, as manifestações apresentadas não podem ser atribuídas apenas a ação do *Cryptosporidium* spp., porém este agente pode ter contribuído para os transtornos relatados.

Já os animais positivos que não apresentaram nenhum tipo de manifestação clínica, corresponderam a 23,53% (04/17) da espécie marinha e 100% (02/02) da amazônica, comportando-se como portadores assintomáticos, indicando certa resistência à infecção, porém permaneceram eliminando oocistos no ambiente, destacando a sua importância epidemiológica na disseminação da doença.

Frente aos achados e diante das possibilidades de veiculação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. surge a necessidade das Instituições, que mantêm estas espécies cativas, reavaliarem os procedimentos de manejo, de maneira a evitar a disseminação deste agente entre os animais. Já nas populações mantidas em vida livre, o melhor método de minimizar a infecção por este parasito é incentivar políticas públicas para saneamento básico e controlar a preservação e manutenção dos mananciais aquáticos.

## 5.7 Conclusões

A infecção por *Cryptosporidium* spp. foi constatada em peixes-boi amazônicos e peixes-boi marinhos, sendo observado que os animais cativos desta última espécie apresentam grande possibilidade de infectar-se pelo coccídio e posteriormente eliminar oocistos, acarretando na disseminação da enfermidade;

O caráter zoonótico da criptosporidiose associado aos achados deste trabalho aponta para uma necessidade de novos esforços de investigação, visando avaliar os aspectos epidemiológicos envolvidos na disseminação deste parasito.

## 5.8 Referências

BORGES, J. C. G. et al. *Cryptosporidium* spp em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) cativo no Centro Mamíferos Aquáticos, Ilha de Itamaracá, no estado de Pernambuco. In: CONGRESSO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA, 1. **Resumos**, Guarapari, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Infecções oportunistas por parasitas em AIDS: técnicas de diagnóstico**. Brasília, DF. 1996. 27 p.

BUCK, C. D.; SCHROEDER, J. P. Public Helth Significance of Marine Mammal Disease. In: DIERAUF L. A. (ed). **CRC Handbook of marine mammal medicine: Helth, disease and rehabilitation**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 163-173.

CANTUSIO-NETO, R.; FRANCO, R. M. B. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 118, p. 52-59, 2004.

FAYER, R. et al. Temporal variability of *Cryptosporidium* in Chesapeake Bay. **Parasitology Research**, New York, v. 88, p. 998-1003, 2002.

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 11, p. 531-536, 2004.

FERGUSON, C. M. et al. Retationships Between Indicators, Pathogens and Water Quality in an Estuarine System. **Water Research**, New York, v. 30, n. 9, p. 2045-2054. 1996.

FREIRE-SANTOS, F. et al. Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. **Veterinary Parasitology**, Philadelphia, v. 87, p. 1-7, 1999.

GOMES, A. H. S. et al. Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em águas de fontes naturais e comparação com análises bacteriológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 61, n. 1, p. 59-63, 2002.

HARTMAN, D. S. Ecology and behavior of the manatee (*Trichechus manatus*) in Florida. **American Society of Mammalogists**, Lawrence, Special Publication, n. 5, 153p, 1979.

HELLER, L. et al. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos a saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 13, n. 11, p. 79-92, 2004.

HILL, B. D.; FRASER, I. R.; PRIOR, H. C. *Cryptosporidium* infection in a dugong (*Dugong dugon*). **Australia Veterinary Journal**, Brunswich, v. 75, n. 9, p. 670-671, 1997.

HOSKIN, J. C.; WRIGHT, R. E. *Cryptosporidium*: an emerging concern for the food industry. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, p. 53-57, 1991.

IBAMA. **Mamíferos Aquáticos do Brasil: Plano de Ação**. Versão 2. 2. ed. Brasília, 2001. 102 p.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. 2006. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 19 nov 2006.

LeCHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D.; LEE, R. G. Ocurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. In surface water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 9, p. 2610-2616, 1991.

LIMA, E. C.; STAMFORD, T. L. M. *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático: aspectos da disseminação e diagnóstico. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro. v. 8. n. 3. p. 791-800, 2003.

LIMA, R. P. **Peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*): distribuição, status de conservação e aspectos tradicionais ao longo do litoral nordeste do Brasil.** 1997. 80f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LIMA, R. P. et al. Levantamento da distribuição, ocorrência e status de conservação do peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*, Linnaeus, 1758) no litoral nordeste do Brasil. Peixe-Boi: **Coletânea de Trabalhos de Conservação e Pesquisa de Sirênios no Brasil.** MMA/IBAMA, v. 1, n. 1, p. 47-72, 1992.

LUNA, S. et al. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiales em Costa Rica. **Parasitologia Latinoamericana**, Casilla, v. 57, p. 63-65, 2002.

MARCH, H.; O'SHEA, T. J.; BEST, R.C. Research on Sirenians. *Ambio a Journal of the Human Environment.* **Marine Mammals Science**, San Francisco, n.15, n.3, p. 177-180, 1986.

MARCONDES, M. C. C. et al. *Cryptosporidium* sp in Antillean Manatees (*Trichechus manatus manatus*) in natural captivity, Paraíba state, Brazil. **Florida Marine Mammal Health Conference**, Gainesville. 2002, Disponível: <<http://www.vetmed.utl.edu>>, Acesso em 29 jul 2002.

MONGE, L.; ARIAS, M. L. Presencia de microorganismos patogenos em hortalias de consumo cruo em Costa Rica. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 46, n. 4, p. 292-294, 1996.

MORGAN, U. M. et al. Detection of the *Cryptosporidium parvum* "Human" Genotype in a Dugong (*Dugong dugon*). **Journal for Parasitology**, Kan, v. 86, p. 1352-1354, 2000.

ORTEGA, Y. R. et al. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of na endemic region in Peru. **The American Journal of Tropica Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 57,n. 6, p. 683-686, 1997.

PALUDO, D. **Estudos sobre a Ecologia e Conservação do Peixe-boi Marinho (*Trichechus manatus manatus*) no Nordeste do Brasil.** 1998. 68 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

PARENTE, C. L.; VERGARA-PARENTE, J. E.; LIMA, R. P. Strandings of Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*) in northeastern Brazil. **The Latin American Journal of Aquatic Mammals**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 69-76, 2004.

PIANTA, C. Diarréia neonatal de origem bacteriana em bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 23, n. 1, p. 107-115, 1993.

QUEIROZ H. Aspectos Ecológicos da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Amanã. Disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br>>, Acesso: 10 jun 2006.

ROBERTSON, L. J.; CAMPBELL, A. T.; SMITH, H. V. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 58. p. 3494-3500, 1992.

STERLING, C. R.; ARROWOOD, M. J. Detection of *Cryptosporidium* sp. Infections using a direct immunofluorescent assay. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Philadelphia, n. 5, p. 139-142, 1986.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para Diagnóstico das Helminthoses de Ruminantes.** 3 ed. Porto Alegre: UFRGS, 1994, 163 p.

WHITE, J. R.; FRANCIS-FLOYD, R. Marine Biology and Medicine, In: DIREAUF, L. A. (ed). **CRC Handbook of marine mammal medicine: health, disease and rehabilitation**, Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 601-623.

## **CAPÍTULO 4**

### **OCORRÊNCIA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. NA ÁGUA DESTINADA A MANUTENÇÃO DOS PEIXES-BOI MARINHOS (*Trichechus manatus*) EM CATIVEIRO**

## 6. OCORRÊNCIA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. NA ÁGUA DESTINADA A MANUTENÇÃO DOS PEIXES-BOI MARINHOS (*Trichechus manatus*) EM CATIVEIRO

### 6.1 Resumo

*Cryptosporidium* é um parasito comumente encontrado em lagos e rios, especialmente quando a água é contaminada por esgotos e resíduos animais. No entanto, existem poucas informações sobre a contaminação da água por este patógeno, sobretudo em cativeiro onde são mantidos mamíferos aquáticos. A finalidade da pesquisa foi avaliar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água de consumo e abastecimento das piscinas destinadas aos peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*). Para tanto, foram coletadas seis amostras de água, provenientes do ponto de abastecimento das piscinas (praia), água destinada ao consumo dos animais, água mineral utilizada na formulação da dieta láctea ofertada aos filhotes órfãos e das piscinas destinadas a manutenção permanente, reabilitação com filhotes de idade superior a dois anos e reabilitação com filhotes de idade inferior a dois anos. Antes das amostras serem processadas, estas foram submetidas ao processo de filtração. Posteriormente o diagnóstico do parasito foi realizado pela técnica de Kinyoun e as amostras positivas foram submetidas ao Teste de Imunofluorescência Direta. Os resultados revelaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 66,67% (04/06), correspondendo ao material proveniente do ponto de abastecimento dos recintos e das piscinas, sendo encontrado de oito a 56 oocistos/litro. Os resultados evidenciaram que a água destinada a manutenção dos peixes-boi marinhos, pode ser um ponto importante na transmissão de oocistos de *Cryptosporidium* spp. predispondo a possibilidade de ocorrência da criptosporidiose em sirênios.

Palavras-Chave: Sirênios, coccídio, diagnóstico

### 6.2 Abstract

*Cryptosporidium* is a parasite commonly found in lakes and rivers especially when the water is contaminated with sewage and animal wastes. However a few data about the contamination of water by this pathogen, especially in captive aquatic mammals are available. The goal of this research was to evaluate the occurrence of oocysts of *Cryptosporidium* spp. in the water destined for Antillean manatee (*Trichechus manatus*) consumption and the pools. Six water samples were collected, from the pool's water

supply system (on the beach); manatees consumption; mineral water used in the preparation of artificial milk formulas offered to the orphaned manatee calves; and the last one used on maintenance of the pools of the visitation area, the rehabilitation area, where lives calves from two or more years-old and from less than two years-old. Before the water samples were processed, each sample was submitted to a filtration process. After the diagnosis of the parasite were processed by Kinyoun technique and the positive samples were submitted to the Direct Immunofluorescence Test. The results showed the presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in 66,67% (04/06), from water supply system and pool's with the eight to 56 oocysts per liter. The results evidenced that the water destined to the maintenance of the Antillean manatees could be important point in a hydric transmission of *Cryptosporidium* spp. oocysts and may also play as a predisposing factor to the occurrence of cryptosporidiose in sirenians.

Keyword: Sirenians, coccidian, diagnosis

### 6.3 Introdução

O *Cryptosporidium* spp. é considerado um protozoário oportunista, que acomete uma ampla variedade de animais e o homem (GÓMES et al., 1996; XIAO et al., 1998; MATSUBAYASHI et al., 2005), podendo provocar quadros de diarréia aquosa, perda de peso e dores abdominais (HILL et al., 1997; BARALDI et al., 1999; BORGES et al., 2005).

A contaminação dos recursos hídricos provenientes dos resíduos agropecuários, industriais e domésticos (LeCHEVALLIER et al., 1991; SMITH, 1993) por este coccídeo vem despertando atenção em diversos países, seja em águas superficiais bruta ou tratada (LeCHEVALLIER et al., 1991; WARD et al., 2002; GOMES et al., 2002; LUNA et al., 2002; HELLER et al., 2004), água mineral (FRANCO e CANTUSIO NETO, 2002), em poços (GAMBA et al., 2000), esgotos tratados ou não (SMITH, 1998; FARIAS et al., 2002), águas marinhas e estuarinas (FAYER, 2004). Além disso, a sobrevivência dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em condições ambientais por longos períodos, aliado a capacidade de resistir aos mais variados métodos usados em tratamento da água, vem a favorecer em sua disseminação (ROSE, 1990; KORICH et al., 1990; ROBERTSON et al., 1992; FAYER, 1997; FAYER, 2004).

Desta forma, esta pressão aplicada aos recursos hídricos tem acarretado na contaminação de diversos organismos aquáticos por oocistos de *Cryptosporidium* spp.,

tais como ostras (GÔMES-COUSO et al., 2003; FAYER et al., 2003), peixes (ALVAREZ-PELLITERO e SITJÀ-BOBADILLA, 2002), tartarugas marinhas (GRACZYK et al., 1997) e ainda infecção de algumas espécies de mamíferos aquáticos (MORGAN et al., 2000; HUGHES-HANKS et al., 2005), incluindo o peixe-boi marinho (BORGES et al., 2005).

Nestes, a veiculação hídrica foi apontada como um possível meio de disseminação do agente, conforme descrito por Hughes-Hanks et al. (2005), nos casos de infecções em focas-aneladas (*Phoca hispida*), baleia da Groenlândia (*Balaena mysticetus*) e baleia-franca do norte (*Eubalaena glacialis*).

Portanto, a ocorrência deste coccídio em peixes-boi marinhos cativos, surge como fator de preocupação, mediante a possibilidade de disseminação dos oocistos, haja visto que a água contaminada pode rapidamente atingir um grande número de hospedeiros susceptíveis.

Neste trabalho teve-se por objetivo avaliar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água de consumo e abastecimento das piscinas dos peixes-boi marinhos.

## **6.4 Material e Métodos**

### **6.4.1 Coleta de Água para Pesquisa de *Cryptosporidium***

Foram coletadas amostras de águas superficiais, em galões de cinco litros, provenientes do ponto de abastecimento das piscinas (área marinha costeira situada nas imediações das instalações), ofertada aos animais (proveniente do abastecimento público), água mineral utilizada na formulação da dieta láctea ofertada aos filhotes órfãos e água das piscinas destinadas a manutenção permanente, reabilitação com filhotes de idade superior a dois anos e reabilitação com filhotes de idade inferior a dois anos (Figura 1), das instalações do Centro Mamíferos Aquáticos/IBAMA-FMA, localizado na Ilha de Itamaracá (7°44'52"Sul; 34°49'32"Oeste), Estado de Pernambuco – Brasil. Apenas a primeira amostra tratava-se de água bruta, sendo as demais águas tratadas. Além desta observação, é válido destacar que as coletas foram realizadas antes dos recintos serem liberados para a permanência dos animais e após todo o tratamento físico-químico executado.

Todas as amostras foram identificadas e encaminhadas ao Departamento de Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco.



Figura 1: Local de captação de água para abastecimento das piscinas (1); piscinas de manutenção permanente (2); piscinas de reabilitação (3). Fonte: Falcão, G/FMA

#### 6.4.2 Processamento Laboratorial das Amostras de Água

As amostras foram filtradas por pressão negativa usando membrana de ésteres de celulose (47 mm de diâmetro e 3  $\mu\text{m}$  de porosidade)<sup>1</sup>. Para a concentração dos oocistos foi usado o método descrito por Aldom e Chagla (1995) com modificação na etapa de dissolução da membrana em acetona, sendo utilizado a sua eluição com solução contendo Dodecil Sulfato de Sódio (1%) e Tween 80 (1%) e auxílio de uma espátula plástica para raspagem da superfície da membrana (FRANCO et al., 2001).

A partir do volume resultante, sucessivas centrifugações foram realizadas com álcool 95% e 70%, de modo à ressuspender os sedimentos. Em seguida duas alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  do sedimento final foram colocadas em lâminas para microscopia e destinadas a pesquisa de *Cryptosporidium* spp., sendo utilizado o método de coloração Kinyoun (BRASIL, 1996), seguido o teste de imunofluorescência direta (IFD) conforme recomendações do fabricante do Kit Merifluor<sup>2</sup>.

A identificação dos oocistos, nas preparações com coloração de Kinyon foram aquelas descritas por Lima et al. (2004), enquanto que na análise de imunofluorescência direta, consideraram-se as estruturas com tamanho e formato compatíveis, na cor verde-maçã, com ou sem estruturas exibindo fluorescência, conforme as orientações de Sterling e Arrowood (1986).

<sup>1</sup> Mellipore Indústria e Comércio LTDA.

<sup>2</sup> Meridian Bioscience Diagnostics Cincinnati, Ohio.

#### 6.4.3 Análise de Parâmetros Físico-Químicos e Microbiológicos

Duas vezes ao dia foram realizadas análises físico-químicas em todas as piscinas, o qual possibilitou o monitoramento dos parâmetros de temperatura, salinidade, transparência, cloro residual, pH e oxigênio dissolvido. Estes mesmos parâmetros foram empregados em uma avaliação prévia na água de abastecimento (praia), não sendo executado na água destinada ao consumo dos animais (provenientes do abastecimento público e mineral).

Na determinação da transparência, foi utilizado o método clássico do uso do disco de Secchi, medindo cerca de 15 centímetros (cm) de raio, na cor branca e atrelado a uma corda graduada a cada 10 cm, enquanto que para a determinação do cloro residual foram utilizados testes colorimétricos. Os demais parâmetros mencionados foram aferidos pelo Analisador Multi-Parâmetro (portátil, marca WTW® modelo Multi 340i), sendo este um equipamento digital de alta precisão.

Além destes parâmetros analisados, foram realizadas semanalmente análises de coliformes fecais, a partir de amostras devidamente coletadas em frascos apropriados, acondicionados em caixa isopor, mantidos sob refrigeração e transportadas ao Laboratório de Análises da Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Estado de Pernambuco (CPRH).

Os valores encontrados foram comparados aos recomendados pela Instrução Normativa (BRASIL, 2002), em seu capítulo que roga sobre os parâmetros inerentes a qualidade de água.

#### 6.5 Resultados e Discussão

Foram observadas pelo método de Kinyoun e confirmadas pelo teste de imunofluorescência direta (IFD), oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 66,67% (04/06), das amostras analisadas proveniente do ponto de abastecimento das piscinas (AP) e das piscina de manutenção permanente (PMP), reabilitação de filhotes com idade superior à dois anos (PRF>2) e reabilitação de filhotes com idade inferior à dois anos (PRF<2), sendo encontrado de oito a 56 oocistos/litro. Nas amostras inerentes a água ofertada ao consumo (AC) e água mineral utilizada na dieta láctea dos filhotes (AM) não foi encontrada nenhuma estrutura sugestiva aos oocistos deste coccídio (Tabela 1).

Tabela 1. Diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. de acordo com o teste utilizado

Amostras	Método de Kinyon	Teste de IFD
AP	Presença	Presença
PMP	Presença	Presença
PRF>2	Presença	Presença
PRF<2	Presença	Presença
AC	Ausência	Ausência
AM	Ausência	Ausência

IFD (imunofluorescência direta); AP (Ponto de abastecimento das piscinas); PMP (Piscina de manutenção permanente); PRF>2 (Piscina de reabilitação de filhotes com idade superior a dois anos); PRF<2 (Piscina de reabilitação de filhotes com idade superior a dois anos); AC ( água de consumo); AM (Água mineral).

Os dois métodos utilizados na identificação de *Cryptosporidium* spp. apresentaram sensibilidade e confiabilidade nos resultados encontrados. De acordo com Smith (1998), diferentes métodos de diagnóstico têm sido desenvolvidos para a detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água, cada qual com suas vantagens e desvantagens, porém ainda não há um método universalmente aceito.

Após a identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas marinhas costeiras, aumenta a abrangência do comprometimento dos recursos hídricos por este coccídio no Brasil, onde até então somente havia sido descrito em rios (MACHADO, 2006), estações de tratamento, reservatórios destinados ao abastecimento público (MULLER, 1999; HELLER et al., 2004) e águas de poços (GAMBA et al., 2000), mesmo sendo manifestado como fator de preocupação em diversos países, o comprometimento dos ambientes marinhos e estuarinos por este agente (LeCHEVALLIER et al., 1991; FERGUSON et al., 1996; FAYER et al., 2002).

Em observações preliminares do local destinado ao abastecimento das piscinas e imediações, aponta-se a proximidade de estuários, os quais recebem uma grande descarga de dejetos fecais provenientes de humanos e animais, os resíduos industriais e as atividades de pesca relacionadas a carcinocultura, constituindo assim como alguns dos fatores que podem ter acarretado na contaminação deste manancial.

Por sua vez, a presença de oocistos deste coccídio em águas das piscinas, aqui observadas, as quais anteriormente foram submetidas ao tratamento físico-químico,

representa as limitações dos métodos utilizados para a inativação do agente, o que também já foi constatado em águas tratadas destinadas ao uso público (LeCHEVALLIER et al., 1991; MULLER, 1999; HELLER et al., 2004), e de parques aquáticos (CAUSER et al., 2006), sendo apontado o reduzido tamanho deste parasito como fator que favorece a passagem nos processos de filtração, aliado a sua resistência aos desinfetantes comumente utilizados (LeCHEVALLIER et al., 1991; FAYER, 1997).

A desinfecção através do cloro nas concentrações comumente utilizadas nos tratamentos convencionais de água não são efetivas para a inativação deste coccídio (ROSE, 1990), conforme demonstrado por CAMPBELL et al. (1982) ao mencionar a sua capacidade em manter-se viável quando exposto a este produto químico.

Sendo assim, fica evidente a vulnerabilidade em que os peixes-boi marinhos estão expostos, uma vez que a presença de algum animal infectado poderá constituir um risco ainda maior na disseminação dos oocistos para outros espécimes cativos, favorecidos desta forma pela veiculação hídrica.

No que concerne aos resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos (Tabela 2), com base na média dos valores encontrados, apenas a temperatura e a presença de coliformes fecais apresentaram-se em desconformidade aos critérios previamente estabelecidos à Instrução Normativa (BRASIL, 2002), em seu capítulo que apresenta as regulamentações para à qualidade de água.

Tabela 2. Valores encontrados de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e resultados das análises físico-químico e microbiológicas realizadas nas amostras de água.

Amostra	Nº de oocistos/l	Parâmetros Analisados						
		T (°C)	Sal (ppt)	Secchi (cm)	Cl	pH	OD (mg/l)	CF (NMP)
AP	56	29,27	35	101,33	0,0	7,90	1,40	40
PMP	32	28,40	27,20	2,74	0,0	7,30	0,48	1356
PRF>2	24	28,30	27,60	1,39	0,0	7,29	0,56	5490
PRF<2	8	28,50	28,00	0,90	0,0	7,24	0,43	53
AC	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	13
AM	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IN	ND	10-28	20-36	ND	0.5	7,20-8,40	ND	250

T (Temperatura); Sal (Salinidade); Secchi (turbidez); Cl (Cloro); pH (potencial de hidrogênio iônico); OD (Oxigênio Dissolvido); CF (Coliformes Fecais); NA (Não Analisado); ND (Não Definido)

Os resultados apresentados demonstram que, mesmo havendo concordância em grande parte dos valores obtidos em relação aos valores de referência, não foi suficiente para promover a inativação e/ou remoção dos oocistos. Essa capacidade dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. adaptar-se as diferentes variações ambientais, foi demonstrada em estudos de laboratório, ao serem submetidos a diversas temperaturas (FAYER et al., 1998) e salinidade (FREIRE-SANTOS et al., 1999).

Por outro lado, a alta densidade de animais nas piscinas de manutenção permanente, vem a justificar os níveis elevados de coliformes fecais, sendo este utilizado em alguns estudos como parâmetro importante de correlação positiva com a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. (LeCHEVALLIER et al., 1991). De maneira semelhante, a turbidez também tem sido utilizada como indicador de previsibilidade, devido a facilidade de aderência dos oocistos a composto orgânicos e inorgânicos (MEDEMA et al., 1998). No entanto, em decorrência do reduzido número de amostras analisadas, não foi possível estabelecer uma análise estatística entre a presença do parasito e os parâmetros analisados, o que torna oportuno a execução de novas avaliações.

Em parques aquáticos, algumas modificações importantes vêm sendo adotadas para evitar a transmissão de *Cryptosporidium* aos seus usuários, dentre estas, a adequação no sistema de filtração e o seu monitoramento constante, a utilização de ozônio ou ainda a instalação de um sistema ultravioleta (KANJO et al., 2000; CAUSER et al., 2006), onde tais alternativas podem ser replicadas nas instalações destinadas a manutenção dos peixes-boi marinhos, de modo que a utilização de novas metodologias não venha a prejudicar a saúde dos animais presentes.

Além da adequação das instalações, no intuito de propiciar melhorias para a manutenção de mamíferos aquáticos em cativeiro no Brasil, sugere-se a complementação da Instrução Normativa (BRASIL, 2002), em seu capítulo que roga sobre a qualidade da água, a partir da inclusão de diretrizes que determinem a realização de técnicas laboratoriais específicas para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp., de forma semelhante as recomendações do Ministério da Saúde, no que diz respeito a potabilidade da água (BRASIL, 2004).

Sendo assim, a veiculação hídrica de *Cryptosporidium* nas piscinas, além de representar uma preocupação em relação à infecção dos peixes-boi marinhos, também constitui como fator de risco para a infecção dos funcionários, sobretudo aqueles

diretamente envolvidos na manutenção destas instalações e oferta de mamadeiras aos filhotes, tendo em vista a grande adaptação deste agente aos diferentes hospedeiros (XIAO et al., 2002), representando assim um risco para a saúde pública. Além disto, a presença de oocistos no ponto de captação (praia) traz uma preocupação ainda maior, pois o local vem sendo utilizado com grande frequência para atividades recreativas, por banhistas de idades variadas, aumentando desta forma o contingente de pessoas em risco de infecção.

## 6.6 Conclusões

A presença dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ponto de captação (praia) representa o primeiro relato deste coccídeo em águas marinhas costeiras no Brasil;

Os peixes-boi marinhos mantidos em cativeiro, encontram-se expostos ao risco de infecção, tendo em vista, a contaminação por *Cryptosporidium* spp. em sua origem, ou seja, nas áreas marinhas costeiras onde vem sendo realizado a captação da água que abastece as piscinas;

Os métodos de tratamento físico-químico empregados na água das piscinas destinadas a manutenção dos peixes-boi marinhos, não são adequados para promover a remoção e/ou inativação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp.

## 6.7 Referências

ALDO, J. E.; CHAGLA, A. H. Recovery of *Cryptosporidium* spp. Oocysts from water by a membrane filter dissolution method. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, p. 186-187, 1995.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÀ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International Journal for Parasitology**, Oxford, n. 32, p. 1007-1021, 2002.

BARALDI, S. R.; MARQUES, E. G. L.; DIAS, R. M. D. S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na região de Campinas, SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 97-103, 1999.

BORGES, J. C. G. et al. *Cryptosporidium* spp em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) cativo no Centro Mamíferos Aquáticos, Ilha de Itamaracá, no estado de Pernambuco. In: CONGRESSO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA, 1. **Resumos**, Guarapari, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Infecções oportunistas por parasitas em AIDS: técnicas de diagnóstico**. Brasília, DF, 1996. 27p.

BRASIL. IBAMA. **Instrução Normativa Nº 3 de 08 de fevereiro de 2002**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em: 10 jan 2007. 2002.

BRASIL. **Portaria Nº 518 de 25 de março de 2004**. Regulamenta os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, e da outras providências. Brasília, DF: MS/ANVISA, 2004.

CAMPBELL, I. et al. Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. **The Veterinary Record**, London, n. 3, p. 414-415, 1982.

CAUSER, L. M. et al. An outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection at an Illinois recreational waterpark. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 134, p. 147-156, 2006.

FARIAS, E. W. C.; GAMBA, R. C.; PELLIZRI, V. H. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 1, 2002.

FAYER, R. ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. Boca Raton: CRC Press, p. 251, 1997.

FAYER, R. *Cryptosporium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam. p. 1-20, 2004.

FAYER, R.; TROUT, J. M.; JENKINS, M. C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. **Journal of Parasitology**, Kan, n. 84, p. 1165-1169, 1998.

FAYER, R. et al. Contamination of Atlantic Coast Commercial Shellfish With *Cryptosporidium*. **Parasitology Research**, New York, n. 89, p. 141-145, 2003.

FAYER, R. et al. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. **Parasitology Research**, New York, n. 88, p. 998-1003, 2002.

FERGUSON, C. M. et al. Relationships Between Indicators, Pathogens and Water Quality in an Estuarine System. **Water Research.**, New York, v. 30, n. 9, p. 2045-2054, 1996.

FRANCO, R. M. B.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of Cryptosporidial oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of

São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 205-207, 2002.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHADT, R.; CANUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* cysts in raw water from Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 43, p. 109-111, 2001.

FREIRE-SANTOS, F. et al. Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. **Veterinary for Parasitology**, Kan, n. 87, p. 1-7, 1999.

GAMBA, R. C. et al. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, S. Paulo – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 151-153, 2000.

GOMES, A. H. S. et al. Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em águas de fontes naturais e comparação com análises bacteriológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 61, n. 1, p. 59-63, 2002.

GÓMES-COUSO, H. et al. Environmental dispersal of *Cryptosporidium parvum* oocysts and cross transmission in cultured bivalve molluscs. **Parasitology Research**, Oxford, n. 90, p. 140-142, 2003.

GÓMEZ, M. S. et al. A Survey for *Cryptosporidium* spp. in Mammals at the Barcelona Zoo. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 11, p. 1331-1333, 1996.

GRACZYK, T. K. et al. *Cryptosporidium* sp. Infections in Green Turtles, *Chelonia mydas*, as a Potencial Source of Marine Waterborne Oocysts in the Hawaiian Islands. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2925-2927, 1997.

HELLER, L. et al. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 13, n. 2, p. 79-92, 2004.

HILL, B. D.; FRASER, I. R.; PRIOR, H. C. *Cryptosporidium* infection in a dugong (*Dugong dugon*). **Australia Veterinary Journal**. St. Leonards, v. 75, n. 9, p. 670-671, 1997.

HUGHES-HANKS, J. M. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. In Five Marine Species. **Journal of Parasitology**, Kan, v. 91, n. 5, p. 1255-1228, 2005.

KANJO, Y. et al. Inactivation of *Cryptosporidium* spp. Oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by in vitro excystation and animal infectivity. **Water Science Technology**, Oxford, v. 41, p. 119-125, 2000.

KORICH, D. G. et al. Effect of azone, chlorine dioxide, chlorine and monochloroamine on *Cryptosporidium* oocysts viability. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 1423-1428, 1990.

Le CHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D.; LEE, R. G. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 9, p. 2610-2616, 1991.

LIMA, E. C. et al. Avaliação de diferentes técnicas de coloração histoquímica na identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água e leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 11, n. ½, p. 21-26, 2004.

LUNA, S. et al. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. em aguas superficiales em Costa Rica. **Parasitologia Latinoamericana**, Casilla, v. 57, p. 63-65, 2002.

MACHADO, E. C. L. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife/PE**. 2006. 141 f. Tese (Doutorado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MATSUBAYASHI, M. et al. Survey of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. infections in various animals at a zoo in Japan. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Yulee, v. 36, n. 2, p. 331-335, 2005.

MEDEMA, G. J. et al. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 11, p. 4460-4466, 1998.

MORGAN, U. M. et al. Detection of the *Cryptosporidium parvum* “Human” Genotype in a Dugong (*Dugong dugon*). **Journal of Parasitology**, Kan, v. 86, p. 1352-1354, 2000.

MULLER, A. N. B. **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo.** 1999. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROBERTSON, L. J.; CAMPBELL, A. T.; SMITH, H. V. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 58, p. 3494-3500, 1992.

ROSE, J. B. Occurrence and Control of *Cryptosporidium* in Drinking Water. **Drinking Water Microbiology**, New York, p. 294-321, 1990.

SMITH, J. L. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* as Agents of Foodborne Disease. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 56, n. 5, p. 451-461, 1993.

SMITH, H. V. Detection of parasites in the environment. **Parasitology**, New York, n. 117, p. 113-141, 1998.

STERLING, C. R.; ARROWOOD, M. J. Detection of *Cryptosporidium* sp. Infections using a direct immunofluorescent assay. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Philadelphia, n. 5, p. 139-142, 1986.

WARD, P. I. et al. Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe. **Parasitology**, New York, n. 124, p. 359-368, 2002.

XIAO, L. et al. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 1773-1785, 2002.

XIAO, L. et al. Species and Strain-specific Typing of *Cryptosporidium* Parasites in Clinical and Environmental Samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 5, p. 687-692, 1998.

## **CAPÍTULO 5**

### **OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM PEIXES-BOI MARINHOS (*Trichechus manatus*) e FUNCIONÁRIOS ENVOLVIDOS NO MANEJO DA ESPÉCIE**

## **7. OCORRÊNCIA DE *Cryptosporidium* spp. EM PEIXES-BOI MARINHOS (*Trichechus manatus*) E FUNCIONÁRIOS ENVOLVIDOS NO MANEJO DA ESPÉCIE**

### **7.1 Resumo**

A criptosporidiose é considerada mundialmente uma zoonose que pode afetar o homem e um grande número de animais domésticos e silvestres. Entretanto, a infecção em humanos ocorre por caráter antroponótico (entre humanos) ou zoonótico (animal para o homem ou vice-versa). Objetivou-se no presente estudo avaliar a relação entre a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) e em funcionários envolvidos na manutenção destes animais em cativeiro. Para tanto, foram coletadas amostras de 28 peixes-boi marinhos e de 21 funcionários envolvidos nas diversas atividades relacionadas ao manejo destes animais, sendo estas amostras processadas a partir da sedimentação pelo formol-éter e o diagnóstico realizado pela técnica de Kinyoun. Após as análises, as amostras positivas foram submetidas ao Teste de Imunofluorescência Direta. Os resultados revelaram a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em 23,21% (26/112) das amostras de peixes-boi marinhos, sendo os filhotes os mais acometidos. No que concerne aos funcionários, os oocistos deste coccídeo estiveram presentes em 23,80% (10/42) do material analisado. A infecção por *Cryptosporidium* spp. em humanos pode constituir um caminho para a infecção de peixes-boi marinhos, durante os cuidados e manejo dos animais. De maneira semelhante, os animais infectados representam implicações para a saúde pública.

Palavras-Chave: Sirênios, transmissão, humanos

### **7.2 Abstract**

Cryptosporidiosis is world-wide a zoonosis which can affect man and a wide range of domestic and wild animals. However the infection in humans occurs by either anthroponotic (between humans) or zoonotic ((animal to human). The objective in the present study was to verify the relationship between the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Antillean manatee (*Trichechus manatus*) and the staff involved directly in captive animal care and management. Samples from 28 Antillean manatees and 21 employees involved in the diverse were collected and processed by sedimentation by method employing formol-eter and the diagnosis were processed by Kinyon technique.

At the end of the analyzing operations, the positive samples were submitted to the Direct Immunofluorescence Test. The results showed the occurrence of oocysts of *Cryptosporidium* spp. in 23,21% (26/112) of the samples from the Antillean manatees, being the calves the most attempted by the parasite. About the employees, the oocysts of the coccidian were present in 23,80% (10/42) of the analyzed samples. The infection of *Cryptosporidium* spp. in human may constitute a way to infection of Antillean manatees, during the animals care and management. In the same way, the infected animals may represent serious implications to public health.

Keyword: Sirenians, transmission, humans

### 7.3 Introdução

Considerando as divergências existentes acerca da taxonomia do *Cryptosporidium* (MORGAN e THOMPSON, 1998; SULAIMAN et al., 1998; XIAO et al., 2002), atualmente 13 espécies são aceitas (XIAO et al., 2004), sendo estas reportadas acometendo os répteis, peixes, aves e mamíferos, incluindo o homem (O'DONOGHUE, 1995; ALVAREZ-PELLITERO e SITJÀ-BOBADILLA, 2002; FAYER, 2004).

Entre as espécies deste protozoário, o *Cryptosporidium parvum* e o *Cryptosporidium hominis* apresentam a maior prevalência em humanos (SULAIMAN et al., 1998; GONÇALVES et al., 2006), sendo estas espécies também descritas acometendo os mamíferos aquáticos (DENG et al., 2000; MORGAN et al., 2000).

Nestas populações de mamíferos aquáticos, os aspectos epidemiológicos relacionados a ocorrência deste agente ainda não estão bem esclarecidos (DENG et al., 2000), sobretudo o que diz respeito a origem de sua veiculação, o impacto da infecção na saúde destes animais e o papel destas espécies marinhas na transmissão do *Cryptosporidium* para o homem e outros animais (SANTÍM et al., 2005).

Foi sugerido por Deng et al. (2000), que algumas espécies atuam como reservatório do *Cryptosporidium* spp., a exemplo dos leões-marinhos da Califórnia (*Zalophus californianus*). Além desta observação, a contaminação de águas marinhas por resíduos agropecuários, esgotos, descargas fecais de embarcações, são alguns dos fatores apontados como meio de disseminação dos oocistos deste coccídeo aos animais marinhos (HUGHES-HANKS et al., 2005), havendo portanto uma grande influência de distúrbios e interações antrópicas.

Estas suposições acerca da origem dos transtornos nos animais marinhos, foi colaborada com a identificação de *Cryptosporidium hominis* em dugongo (*Dugong dugon*) reforçando as evidências de que a infecção humana pode desencadear a infecção nestes animais (MORGAN et al., 2000), seja decorrente do contato entre estes através da rota fecal-oral ou da ingestão de água e alimentos contaminados.

Em alguns casos, após a infecção nos hospedeiros, a ação do coccídeo pode desencadear alterações gastroentéricas (HILL et al., 1997), acarretando em diversas manifestações clínicas, conforme observado por Borges et al. (2005) em peixe-boi marinho, porém no estudo não foram apresentados aspectos inerentes à origem da infecção e dos fatores epidemiológicos relacionados.

Tendo em vista as estratégias de reabilitação e manutenção adotadas com os peixes-boi marinhos, as atividades relacionadas ao manejo como alimentação, limpeza de piscinas, biometrias, exames clínicos e translocações, requerem uma interação direta dos funcionários com estes animais, sendo algumas destas executadas por um número expressivo de pessoas. Estas situações despertaram para a possibilidade do agente estar sendo veiculado a partir destas ocasiões.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a relação entre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) e os funcionários envolvidos na manutenção destes animais em cativeiro.

## **7.4 Material e Métodos**

### **7.4.1 Coleta de Material Biológico**

#### **7.4.1.1 Animais**

As atividades foram realizadas no Centro Mamíferos Aquáticos/IBAMA-FMA, localizada na Ilha de Itamaracá (7° 44' 52" Sul; 34° 49' 32" Oeste), Estado de Pernambuco-Brasil. Neste local, eram mantidos 28 peixes-boi marinhos, sendo machos e fêmeas, com idade entre uma semana a 43 anos. Destes animais, nove estavam em piscinas de manutenção permanente, sendo que apenas um possuía idade inferior a um ano de idade. Os demais encontravam-se em piscinas de reabilitação, onde em determinados momentos permaneciam individualmente ou em grupos de até cinco indivíduos, com a faixa etária compreendida entre filhotes e juvenis.

Para todos os animais eram ofertados capim-agulha (*Halodule wrightii*) e algas marinhas, sendo acrescentado cenoura e alface para animais mantidos nas piscinas de

manutenção permanente, além de uma formulação láctea para os filhotes órfãos. Entretanto, de acordo com a idade destes animais, as estratégias de manejo adotadas eram distintas, a exemplo da quantidade de biometrias realizadas, avaliações clínicas e amamentação, onde a frequência diminuía ao longo do tempo.

Todos os animais foram submetidos a exames clínicos prévios, e na ocasião da biometria procedeu à coleta de fezes. Este procedimento ocorreu em quatro ocasiões para cada espécime, em intervalos de 60 dias, totalizando 112 amostras fecais. O material foi acondicionado em frascos contendo solução constituída de álcool, formol, ácido acético glacial e água destilada (AFA), de acordo com o sugerido por Ueno e Gonçalves (1994). Os frascos foram devidamente identificados e encaminhados ao Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos (LDPAD), da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

#### 7.4.1.2 Funcionários

No intuito de esclarecer os aspectos inerentes a criptosporidiose, foi ministrada uma palestra aos funcionários do CMA/IBAMA-FMA, com novas informações transmitidas a estes durante o período das atividades, de acordo com o interesse e as dúvidas apresentadas. Posteriormente, contando com a participação espontânea de 21 destes, foram encaminhadas ao LDPAD 42 amostras fecais inerentes a duas coletas de cada pessoa, realizadas em intervalos de 21 dias.

Na ocasião em que as amostras foram entregues, de maneira informal foi perguntado aos funcionários sobre alguma manifestação clínica compatível à ação do coccídio, além disto, foi constatado o enquadramento profissional dos mesmos, onde corresponderam a tratadores de peixes-boi, mergulhadores para coleta de capim-agulha, monitores da qualidade de água das piscinas, serviços gerais, estagiários e médicos veterinários. De acordo com as atribuições requeridas, a interação destes com os animais apresentavam intensidades distintas, porém todos apresentavam algum tipo de contato.

#### 7.4.2 Processamento Laboratorial

##### 7.4.2.1 Animais

Inicialmente as amostras fecais provenientes dos peixes-boi marinhos, foram submetidas à sedimentação pelo formol-éter com posterior confecção dos esfregaços e coloração através da técnica de Kinyoun (BRASIL, 1996), sendo as amostras positivas

submetidas posteriormente a imunofluorescência direta conforme recomendação do fabricante do Kit Merifluor<sup>3</sup>.

Para a identificação dos oocistos, nas preparações com coloração de Kinyoun sob leitura com microscopia óptica, consideraram-se as estruturas ovóides ou esféricas de tamanho compatível a 4-6 µm de diâmetro, que apresentavam coloração vermelha e estruturas internas (LIMA et al., 2004), enquanto que na análise de imunofluorescência direta, consideraram-se as estruturas com tamanho e formato compatíveis, na cor verde-maçã, com ou sem estruturas exibindo fluorescência, conforme Sterling e Arrowood (1986).

#### 7.4.2.2 Funcionários

Posteriormente as análises do material proveniente dos peixes-boi marinhos, procedeu-se o processamento das amostras fecais dos funcionários, sendo utilizado o mesmo método descrito anteriormente para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp.

Além das técnicas utilizadas para o diagnóstico da criptosporidiose, as amostras foram submetidas ao processamento pelo método direto (URQUHART et al., 1996), flutuação (WILLIS, 1927; URQUHART et al., 1996) e sedimentação (WATANABE et al., 1953; SLOSS et al., 1999), no intuito de ser avaliado a presença de outros agentes parasitários.

#### 7.4.3 Análise Estatística

Para avaliar a possibilidade de existir correlação entre a idade dos animais e a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. nos peixes-boi marinhos, foi utilizado o teste de Sperman (CALLEGARI-JACQUES, 2003), a partir dos dados ordenados. De modo semelhante, para avaliar a correlação entre o grau de exposição dos funcionários aos peixes-boi marinhos e a ocorrência da infecção por *Cryptosporidium* spp. foi utilizado o teste de Spearman ( $p < 0,05$ ).

### 7.5 Resultados e Discussão

Com base no material fecal proveniente dos peixes-boi marinhos, foram observados pelo método de Kinyoun, oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 23,21% (26/112) das amostras analisadas, sendo estas confirmadas pelo teste de

---

<sup>3</sup> Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio

imunofluorescência direta. Estes resultados foram referentes a 46,42% (13/28) dos peixes-boi marinhos avaliados e de acordo com a faixa etária dos animais estudados, os filhotes mostraram-se mais susceptíveis a infecção pelo agente (Tabela 1). Entre os animais com diagnóstico positivo, foi observado que 76,92 % (10/13) apresentaram ao longo do período de coleta das amostras fecais, algum sinal clínico sugestivo a ação do agente, tais como quadros de diarreia, desconforto abdominal, aumento do intervalo respiratório, letargia e emagrecimento.

Tabela 1. Frequência absoluta e relativa de peixes-boi marinhos infectados por *Cryptosporidium* spp. nas diferentes faixas etárias

Faixa Etária	Número de Animais	FA	FR (%)	Animais com <i>Cryptosporidium</i> (%)
Adulto	8	3	23,07	37,50 (03/08)
Juvenis	6	2	15,39	33,33 (02/06)
Filhotes	14	8	61,54	57,14 (08/14)
Total	28	13	100	-

FA (Frequência Absoluta); FR (Frequência Relativa)

A frequência encontrada da infecção por *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos cativos, representa um valor expressivo, sobretudo pela facilidade em ser disseminada aos demais animais, constituindo assim como um risco eminente à saúde dos demais espécimes cativos.

Em decorrência da ausência de estudos semelhantes desenvolvidos anteriormente com esta espécie, de maneira a possibilitar avaliações comparativas foi utilizado como base, as pesquisas realizadas com outros mamíferos aquáticos. Desta forma, o resultado inerente a infecção por *Cryptosporidium* constatado neste estudo, apresentou-se ligeiramente acima da média encontrada com outras espécies, sendo relatado a prevalência de 11% em elefante-marinho do norte (*Mirounga angustirostris*) e foca-comum (*Phoca vitulina*), 50% em leões-marinhos da Califórnia (DENG et al., 2000), 5,1% em baleia da Groenlândia (*Balaena mysticetus*), 22,6% em foca-anelada (*Phoca hispida*) e 24,5% em baleia-franca do norte, *Eubalaena glacialis* (HUGHES-HANKS et al., 2005).

A frequência da infecção por *Cryptosporidium* spp. entre os filhotes de peixes-boi marinhos, diferem das constatações observadas por Hughes-Hanks et al. (2005),

onde relataram que em populações de foca-anelada a faixa etária mais acometida foi de indivíduos com idade superior a sete anos. Entretanto, em diversas espécies de mamíferos terrestres, a prevalência da criptosporidiose tem sido maior em filhotes, assim como a apresentação de sinais clínicos mais severos (SIMPSON et al., 1988; DUBEY et al., 1990; O'DONOGHUE, 1995; PENA et al., 1997; FUENTE et al., 1999).

Em analogia a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros, a maior susceptibilidade destes foi atribuída a presença de infecções concomitante, a imaturidade do sistema imune e ainda aos fatores relacionados ao manejo, como a interação direta entre os animais, a alta densidade nas instalações, a qualidade da água e os alimentos ofertados (MALDONADO-CAMARGO et al., 1998; BECHER et al., 2004). Colaborando com estas informações, foi sugerido por Borges et al. (2006) que a infecção de peixe-boi marinho pode ser resultante da contaminação dos ambientes costeiros, a oferta de itens alimentares, a manipulação de alimentos por tratadores e o contato direto destes com os animais.

Desta forma, estas constatações justificam a infecção em filhotes de peixes-boi marinhos provenientes do “habitat” natural e atualmente mantidos em processo de reabilitação, onde imediatamente após as atividades de resgate de quatro espécimes foi possível coletar e analisar amostras fecais antes destes serem encaminhados as piscinas de reabilitação, sendo realizadas posteriormente três coletas seguintes, com intervalos de 60 dias. Inicialmente todas as amostras apresentaram os primeiros resultados negativos, posteriormente dois animais apresentaram a infecção a partir do terceiro exame e os dois outros indivíduos, somente foi diagnosticado o agente na quarta análise. Sendo assim, a infecção destes animais foi relacionada a fatores ligados ao manejo.

Com isto, além da possibilidade de veiculação dos oocistos para estes animais através da água e alimentos contaminados, acredita-se que o contato destes com humanos, sobretudo os funcionários envolvidos no manejo, pode ter constituído como meio importante de veiculação do agente, em decorrência das práticas de higiene inadequada.

Para avaliar a influência das atividades de manejo nos peixes-boi marinhos, foram agrupados os espécimes em processo de reabilitação (compreendendo as categorias de idade de filhotes e juvenis), em virtude da semelhança da rotina adotada, no que diz respeito à alimentação, características das piscinas, contato com tratadores e técnicos. Nesta análise foi utilizada a frequência de biometrias, como indicador da intensidade de manejo (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência de biometrias e infecção por *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi marinhos em reabilitação

Idade dos Animais	Frequência das biometrias	Número Total de biometrias no período	Infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp.
1 mês	Semanal	4	0% (00/08)
2 – 3 meses	Quinzenal	4	25% (02/08)
4 – 12 meses	Mensal	9	50% (04/08)
13 – 36 meses	Bimestral	12	70% (07/10)

O teste estatístico de Sperman indicou a existência de correlação negativa entre a frequência do manejo e o percentual da infecção de *Cryptosporidium* spp. nos peixes-boi marinhos em processo de reabilitação ( $r = -0,9986$ ;  $p = < 0,001$ ). Neste sentido, no transcorrer do processo de reabilitação, quanto maior a exposição dos animais ao manejo, de forma diretamente proporcional foi observada a infecção pelo *Cryptosporidium* spp.

No Brasil, entre as atividades conservacionistas em benefício dos peixes-boi marinhos, vêm sendo realizada de forma bem intencionada a reintrodução de espécimes após o processo de reabilitação (LIMA e ALVITE, 2006), porém a partir da ocorrência de *Cryptosporidium* spp. acometendo alguns animais, desperta para os riscos do coccídio ser disseminado para as populações nativas, conforme observado na transmissão de outros patógenos em diversas espécies animais (MARINI e FILHO, 2006).

No que concerne aos funcionários, de acordo com a morfologia, coloração e tamanho, oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram observados em 23,80% (10/42) do material analisado, através do método de Kinyoun e submetido a confirmação pelo teste de imunofluorescência direta.

Com base nas atividades desenvolvidas, os tratadores apresentaram o maior percentual de pessoas com a infecção pelo coccídio, entre as categorias analisadas (Tabela 3).

Tabela 3. Grau de Exposição e Frequência da Infecção nos diferentes enquadramentos profissionais de funcionários envolvidos nas atividades de manejo dos peixes-boi marinhos cativos

Enquadramento Funcional	Grau de Exposição	Número de Funcionários	FA	FR (%)	Funcionários com <i>Cryptosporidium</i> (%)
Tratadores	Alta	4	4	40	100
Mergulhadores	Baixa	3	1	10	33,34
Monitores da Qualidade de H <sub>2</sub> O	Alta	4	-	-	-
Serviços Gerais	Baixa	5	4	40	80
Estagiários	Baixa	3	-	-	-
Veterinários	Média	2	1	10	50
Total	-	21	10	100	-

Baixa (até 15h/mês); Média (16-80h/mês); Alta (acima de 80h/mês)

FA (Frequência Absoluta); FR (Frequência Relativa)

Foi constatado ainda, a presença de outros agentes parasitários como *Ancylostoma* sp. e/ou *Ascaris lumbricoides* em 33,34% (14/42) das amostras analisadas, onde a associação destes com os oocistos de *Cryptosporidium* spp. ocorreu em 7,14% (03/42) das ocasiões. Entre as informações obtidas dos funcionários, em nenhuma ocasião foi mencionado algum tipo de manifestação clínica que pudesse ser relacionada a ação do agente.

De acordo com Morgan et al. (2000), após identificar a ocorrência de *Cryptosporidium hominis* em dugongos, evidenciaram que outros mamíferos aquáticos também podem infectar-se e constituir como reservatório para a criptosporidiose humana, o que torna um fator de preocupação, a presença deste coccídio em peixes-boi marinhos.

O resultado da análise de correlação utilizando o teste de Spermán indicou que não houve correção entre o grau de exposição dos funcionários aos animais e a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. ( $r_s = 0,4058$ ;  $t = 0,8881$ ;  $p = 0,4246$ ). Porém mesmo não sendo evidenciado pelas análises estatísticas existir esta correlação, em virtude das atribuições relacionadas no manejo dos peixes-boi marinhos, que acarretam em alta exposição dos tratadores a estes animais, pode justificar a presença da infecção

em todos os funcionários deste enquadramento profissional. Relação semelhante foi descrita por Fayer e Ungar (1986) e Levine et al. (1988) ao atribuírem a infecção em estudantes de veterinária e tratadores, ao provável contato com animais infectados.

No entanto é válido destacar que mesmo apresentando alto contato com os peixes-boi e ainda com os resíduos fecais, durante os procedimentos de limpeza das piscinas, não foi observado a infecção nos monitores da qualidade de água. Em contrapartida, o alto percentual da infecção nos funcionários de serviços gerais, mesmo com a baixa exposição requerida a estes ao contato com os animais, demonstra que outros fatores além do contato com os animais podem desencadear a infecção. Este fato ficou evidente após avaliar as amostras fecais provenientes de um funcionário desta última categoria mencionada, onde o mesmo recém ingressava na Instituição, não havendo apresentado nenhum tipo de contato anterior com os peixes-boi, no entanto já apresentava a infecção pelo coccídio.

Ao término das atividades laboratoriais, foi recomendado a busca por serviços médicos especializados aos funcionários que apresentaram a infecção pelo *Cryptosporidium* spp., no entanto somente a adoção de protocolos terapêuticos prescritos não serão eficientes, haja visto, a ausência de informação prévia sobre a criptosporidiose humana, bem como fatores relacionados na disseminação e controle por boa parte dos envolvidos. Além disto, a associação do *Cryptosporidium* spp. a outros agentes parasitários pode representar limitações nas medidas de higiene pessoal adotadas por estes.

Sendo assim, torna-se oportuno a realização de exames constantes em todos os funcionários que apresentem qualquer tipo de contato com os animais, bem como a elaboração de novas atividades de caráter informativo sobre a criptosporidiose, com abordagens específicas aos diferentes perfis dos profissionais envolvidos. Através destes conhecimentos adquiridos por parte de todos os funcionários envolvidos, haverá a possibilidade de consolidar a adoção de medidas que favoreçam no controle e disseminação do *Cryptosporidium*, seja através da higiene pessoal ou nos cuidados relacionados aos animais.

## **7.6 Conclusões**

A presença de humanos com a infecção por *Cryptosporidium* spp. pode constituir como meio de veiculação dos oocistos aos peixes-boi marinhos, através do contato realizado nas atividades de manejo. De maneira semelhante, os animais infectados representam implicações para a saúde pública, pois podem disseminar oocistos e vir a desencadear a infecção nos funcionários, constituindo assim, como um novo reservatório para este agente.

## 7.7 Referências

ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÀ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International Journal for Parasitology**, Oxford, n. 32, p. 1007-1021, 2002.

BECHER, K. A. et al. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. **Veterinary Parasitology**, Kan, v. 123, p. 1-9, 2004.

BORGES, J. C. G. et al. *Cryptosporidium* spp em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) cativo no Centro Mamíferos Aquáticos, Ilha de Itamaracá, no estado de Pernambuco. In: CONGRESSO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA, 1. **Resumos**, Guarapari, 2005.

BORGES, J. C. G. et al. Infecção por *Cryptosporidium* spp.: uma ameaça à conservação dos peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus manatus*) e amazônicos (*Trichechus inunguis*). In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE NA AMAZÔNIA E AMÉRICA LATINA, 7., **Resumos**, Ilhéus, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Infecções oportunistas por parasitas em AIDS: técnicas de diagnóstico**. Brasília, DF, 1996, 27p.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. Bioestatística. **Princípios e Aplicações**. Artmed Editora, Porto Alegre, 255 p. 2003.

DENG, M.; PETERSON, R. P.; CLIVER, D. O. First findings of *Cryptosporidium* and *Giardia* in California sea lions (*Zalophus californianus*). **Journal of Parasitology**, Kan, v. 86, p. 490-494, 2000.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. *Cryptosporidiosis of man and animals*. Boston: CRC, 1990.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonótico parasite. **Veterinary for Parasitology**, Kan, p. 1-19, 2004.

FAYER, R.; UNGAR, B. L. P. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. **Microbiological Review**, Washington, v. 50, p. 456-483, 1986.

FUENTE, R de la. et al. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enterophatogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. **Veterinary for Parasitology**, Kan, v. 80, p. 179-185, 1999.

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

HILL, B. D.; FRASER, I. R.; PRIOR, H. C. *Cryptosporidium* infection in a dugong (*Dugong dugon*). **Australia Veterinary Journal**. Brunswichv. 75, n. 9, p. 670-671. 1997.

HUGHES-HANKS, J. M. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. In Five Marine Species. **Journal of Parasitology**, Kan, v. 91, n. 5, p. 1255-1228, 2005.

LEVINE, J. F. et al. Cryptosporidiosis in Veterinary student. **Journal of the American Medicine Veterinary Association**, Chicago, v. 193, p. 1413-1414, 1988.

LIMA, R. P.; ALVITE, C. M. de CARVALHO. Protocolo de Reintrodução de Peixes-boi Marinhos (*Trichechus manatus manatus*) no Brasil. In REUNIÓN INTERNACIONAL SOBRE EL ESTUDIO DE LOS MAMÍFEROS ACUÁTICOS SOMEMMA – SOLAMAC, 1. **Resumos**, Mérida, p. 73, 2006.

LIMA, E. C. et al. Avaliação de diferentes técnicas de coloração histoquímica na identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água e leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 11, n.1/2, p. 21-26, 2004.

MALDONADO-CAMARGO, S. et al. Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central México. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 36, p. 95-107, 1998.

MARINI, M. A.; FILHO, J. S. M. Translocação de aves e mamíferos: Teoria e prática no Brasil. P. 505-536. In ROCHA, C. F. D. et al. **Biologia da Conservação – Essências**. Ed. Rima, São Carlos. 2006.

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

MORGAN, U. M. et al. Detection of the *Cryptosporidium parvum* “Human” Genotype in a Dugong (*Dugong dugon*). **Journal of Parasitology**, Kan, v. 86, p. 1352-1354, 2000.

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

PENA, H. F. J.; KASAI, N.; GENNARI, S. M. *Cryptosporidium muris* in dairy cattle in Brazil. **Veterinary for Parasitology**. v. 73, p. 353-355, 1997.

SANTÍN, M.; DIXON, B. R.; FAYER, R. Genetic Characterization of *Cryptosporidium* Isolates From Ringed Seals (*Phoca hispida*) in Northern Québec, Canada. **Journal of Parasitology**, Kan, v. 91, n. 3, p. 712-716, 2005.

SIMPSON, J. W. et al. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* infection in dogs from Edinburgh. **The Veterinary Record**, London, v. 123, n. 17, p. 445, 1988.

SLOSS, M. W.; ZAJAC, A. M.; KEMP, R. L. **Parasitologia Clínica Veterinária**. 6 ed. São Paulo: Manole, 1999, p. 3-17.

STERLING, C. R.; ARROWOOD, M. J. Detection of *Cryptosporidium* sp. Infections using a direct immunofluorescent assay. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Philadelphia, n. 5, p. 139-142, 1986.

SULAIMAN, I. M. et al. Differentiating Human from Animal Isolates of *Cryptosporidium parvum*. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 4, p. 681-685, 1998.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para Diagnóstico das Helmintoses de Ruminantes**. 3 ed. Porto Alegre: UFRGS, 1994. 163 p.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 239-241.

WATANABE, S.; NAGAYAMA, I.; IWATA, K. A simple method for detection of *Fasciola* ova in bovine feces. **Journal Veterinary Medical Association**, p. 176-177. Japan. 1953.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medical Journal Australia**, Sidney, p. 375-376. 1927.

XIAO, L. et al. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 1773-1785, 2002.

XIAO, L. et al. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.

## **CAPÍTULO 6**

### **CRIPTOSPORIDIOSE: UMA AMEAÇA A CONSERVAÇÃO DOS MAMÍFEROS AQUÁTICOS NO BRASIL**

## 8. CRIPTOSPORIDIOSE: UMA AMEAÇA A CONSERVAÇÃO DOS MAMÍFEROS AQUÁTICOS NO BRASIL

### 8.1 Resumo

A criptosporidiose é uma doença parasitária emergente que vem sendo relatada em diversas espécies de mamíferos, incluindo os aquáticos. Esta revisão trata da epidemiologia da infecção por *Cryptosporidium* spp. em mamíferos aquáticos. A idade dos animais, dose infectante e o estado imunológico podem influenciar na apresentação clínica, e quando associados a outros patógenos pode levar o animal a óbito. A contaminação dos recursos hídricos constitui um dos principais meios de disseminação do parasito, que foi identificado por diferentes técnicas de análise. A adequação das estruturas de saneamento, utilização de métodos apropriados para a inativação dos oocistos e garantia das normas de higiene pessoal constituem algumas das maneiras recomendadas para minimizar a disseminação do *Cryptosporidium* entre os mamíferos aquáticos.

Palavras-Chave: Mamíferos aquáticos, zoonose, *Cryptosporidium*

### 8.2 Abstract

The cryptosporidiosis is an emerging parasitic disease that has been related in several mammal species, including the aquatic ones. This review covers the epidemiology infection in aquatic mammals. The age of the animal, infecting dose and immunological state can influence on the clinical presentation, and when associated with other pathogen, can lead the animal to death. The contamination of water supply is one of the major ways of the pathogen dissemination, which was being identified by different techniques of laboratorial analysis. The adequacy of sanitation structures, the use of appropriate method to inactivate the oocysts and the assurance of personal hygiene norms are some of the recommended way to minimize the dissemination of *Cryptosporidium* among aquatic mammals.

Keywords: Aquatic mammals, zoonosis, *Cryptosporidium*

### 8.3 Introdução

Segundo o Plano de Ação para Mamíferos Aquáticos (IBAMA, 2001), existem 50 espécies presentes em águas brasileiras, sendo 39 Cetáceos, sete Pinípedes, dois Mustelídeos e dois Sirênios. A distribuição destes animais é de extrema abrangência, visto que as espécies marinhas ocorrem de forma contínua nos 8.000 quilômetros (Km) de litoral, podendo ainda ser comumente encontrados em estuários, baías e bocas dos rios destas regiões litorâneas (FLORES, 1999; IBAMA, 2005), enquanto que as fluviiais são encontradas na maioria dos principais rios e lagos de águas interiores (DA SILVA, 1984; ROSAS, 1991; BEST, 1993; DA SILVA & MARTIM, 2000; CIMARDI, 1996).

Estas espécies estão sujeitas aos diversos fatores que ameaçam as suas populações, dentre estes: o tráfego de embarcações (CÂMARA & PALAZZO JÚNIOR, 1984, PÉREZ, 2003; SIMÕES-LOPES, 2005), mortalidade acidental em rede de pesca (DI BENEDITTO, 2004), atividades petrolíferas (PARENTE & ARAUJO, 2005), degradação e contaminação dos ambientes costeiros e de águas interiores (ROSAS & LETHI, 1996), caça intencional (LIMA, 1997; LUNA, 2001) e a ocorrência de diversos agentes etiológicos, tais como vírus (RECTOR et al., 2004), bactérias (VERGARA-PARENTE et al., 2003) e protozoários (DUBEY et al., 2003).

Entre as manifestações ocasionadas por protozoários, a criptosporidiose vem sendo considerada como uma doença emergente, oportunista (XIAO et al., 1998) e de distribuição cosmopolita (CURRENT, 1983), além de apresentar um caráter zoonótico (FAYER et al., 2004).

Estudos filogenéticos vêm sendo realizados por vários grupos de pesquisadores, porém ainda há divergências quanto à taxonomia do *Cryptosporidium*. De acordo com Xiao et al. (2004), 13 espécies e alguns tipos de genótipos foram identificados acometendo aves, répteis, peixes (LEVINE, 1984; ALVAREZ-PELLITERO & SITJA-BOBADILLA, 2002) e aproximadamente 150 hospedeiros mamíferos, incluindo o homem (FAYER et al., 2000; XIAO et al., 2004).

A ausência de maiores informações sobre *Cryptosporidium* spp. acometendo estes animais, dificulta as Instituições que mantêm espécimes cativos na adoção de estratégias de manejo que minimizem e/ou eliminem os oocistos deste coccídio, bem como o melhor entendimento dos aspectos sanitários destes animais de vida livre.

Este trabalho teve como objetivo revisar os fatores epidemiológicos relacionados à infecção por *Cryptosporidium* spp. em mamíferos aquáticos.

#### 8.4 Agente Etiológico

O gênero *Cryptosporidium* é classificado como um eucarionte pertencente ao Filo Apicomplexa (LEVINE, 1984). Este protozoário foi encontrado pela primeira vez em 1907, em glândulas gástricas de camundongo, sendo denominado *Cryptosporidium muris* e posteriormente, em 1912, no intestino desta mesma espécie, sendo identificado como *C. parvum* (TYZZER, 1912). Porém, somente após o primeiro surto acometendo aves domésticas em 1950 (SALVIN, 1955) e, sobretudo após os relatos em humanos (LABERGE et al., 1996) foi que este agente passou a ser pesquisado de maneira mais efetiva.

O *Cryptosporidium* spp. é um parasita entérico e desenvolve-se no epitélio da mucosa intestinal ou gástrica de diversos vertebrados, diferindo morfológicamente de todos os outros gêneros da subordem Eimeriina, pois são esféricos ou ovóides, medindo de 3 a 8 µm de diâmetro e possuem internamente quatro esporozoítos (BUTLER & MAYFIELD, 1996).

De acordo com Xiao et al. (2004) atualmente 13 espécies do gênero *Cryptosporidium* são descritas, das quais três (*C. hominis*, *C. muris* e *C. parvum*) já foram diagnosticadas entre os mamíferos aquáticos (MORGAN et al., 2000; DENG et al., 2000; SANTÍN et al., 2005).

#### 8.5 Ciclo Biológico

De acordo com as constatações nos diferentes hospedeiros acometidos pelo *Cryptosporidium* spp., ocorre um ciclo monoxeno, com seis estágios de desenvolvimento no organismo, a saber: excistação, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede do oocisto e esporogonia (GELLIN & SOAVE, 1992; DONNELLY & STENTIFORD, 1997; SMITH & ROSE, 1998).

No transcorrer destes estágios, dois tipos de oocistos são formados, sendo um destes de parede espessa, eliminados nas fezes e resistentes às condições ambientais, sendo responsável pela transmissão do parasito para outros animais; e aqueles de parede delgada, os quais rompem-se no hospedeiro e liberam esporozoítos que invadem células epiteliais não infectadas, responsáveis por auto-infecções (SMITH, 1993; O'DONOGHUE, 1995; XIAO et al., 2004).

A liberação de oocistos presentes nas fezes dos hospedeiros infectados pode acarretar na contaminação de águas superficiais ou reservatórios (SMITH, 1993;

MULLER, 1999; MACHADO, 2006), os quais têm sido reconhecidos como maiores veiculadores do organismo pela possibilidade de atingir um imenso contingente de hospedeiros (LABERGE et al., 1996), incluindo as diferentes espécies de mamíferos aquáticos (Figura 1).

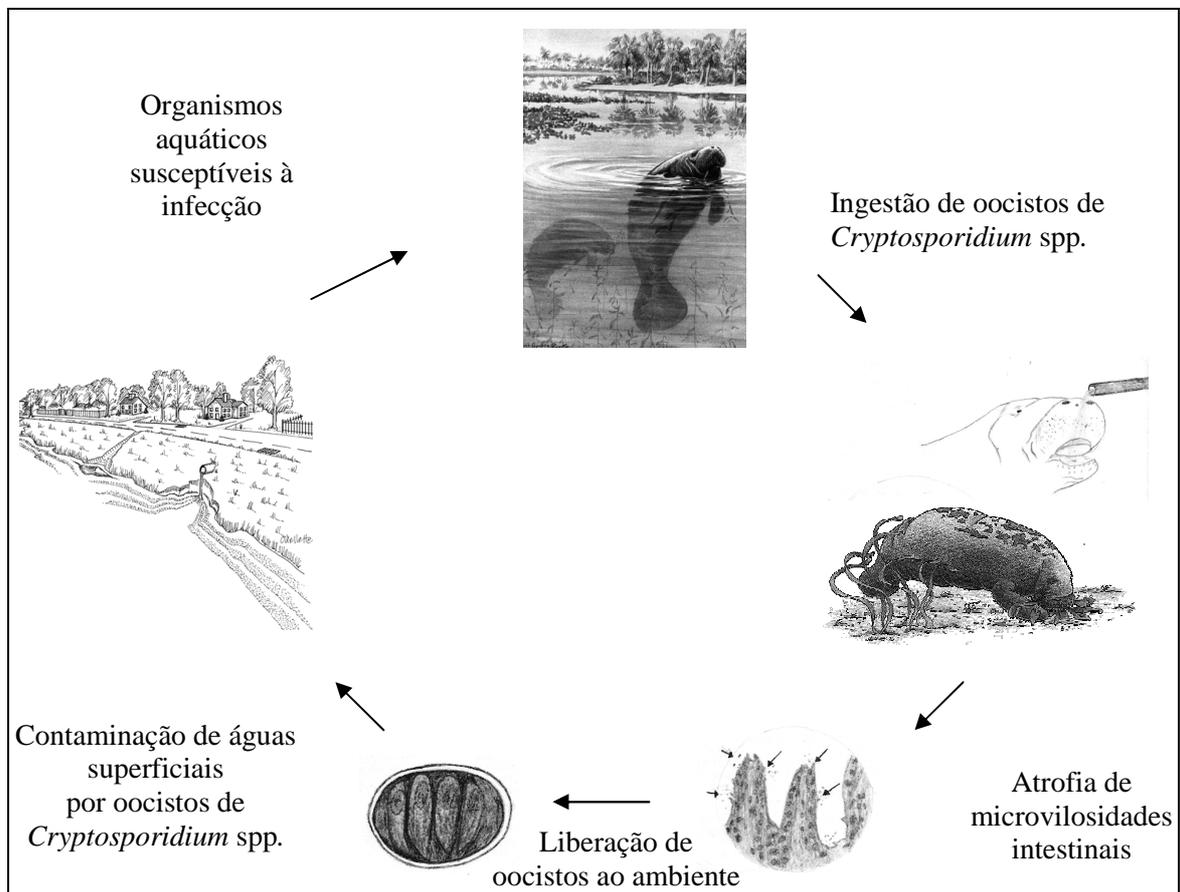


Figura 1: Ciclo de vida do *Cryptosporidium* spp.

### 8.6 Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em Mamíferos Aquáticos

De acordo com Hughes-Hanks et al. (2005) diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas nos ecossistemas terrestres, porém os estudos e informações de agentes parasitários nos ambientes marinhos ainda são reduzidos. Evidências recentes indicaram a presença do *Cryptosporidium* spp. infectando uma variedade de organismos aquáticos, entre estes moluscos e mariscos (FAYER et al., 2004), mexilhão (TAMBURRINI & POZIO, 1999) e ostras (FREIRE-SANTOS et al., 2000).

O primeiro relato deste coccídio acometendo mamíferos aquáticos foi em dugongo (*Dugong dugon*), na Austrália, onde tratava-se de um espécime em estado de

debilidade acentuada, o qual foi eutanasiado e posteriormente submetido a exames “*post-mortem*” (HILL et al., 1997). Posteriormente foram realizadas análises histológicas deste animal, sendo identificado à presença de *Cryptosporidium hominis* (MORGAN et al., 2000).

Com o despertar para os riscos inerentes à presença deste protozoário acometendo os mamíferos aquáticos, os esforços de investigação foram ampliados em diversos países. Deng et al. (2000) detectaram entre os pinípedes, a presença de *C. parvum* em leões-marinhos da Califórnia (*Zalophus californianus*), enquanto que Hughes-Hanks et al. (2005) relataram a presença de *Cryptosporidium* spp. em foca-anelada (*Phoca hispida*), sendo verificada ainda por estes mesmos pesquisadores, a presença deste coccídeo acometendo duas espécies de cetáceos, a baleia-da-Groenlândia (*Balaena mysticetus*) e baleia-franca do norte (*Eubalaena glacialis*).

Entre os Sirênios, além da infecção em dugongo inicialmente descrita, a presença de *Cryptosporidium* spp. também foi relatada em peixes-boi marinhos mantidos cativos no ambiente natural e em oceanários (MARCONDES et al., 2002; BORGES et al., 2005), bem como em peixes-boi amazônicos (BORGES et al., 2006).

## **8.7 Transmissão**

O *Cryptosporidium* spp. pode ser transmitido de várias formas, sendo estas entre humanos, destes para os animais e vice-versa, entre animais ou através da água e alimentos contaminados por fezes animal ou humana, sendo os oocistos já eliminados na forma infectante (BARALDI et al., 1999; FAYER et al., 2004).

Foi constatada a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em rios, lagos, estuários e águas oceânicas (GRACZYK et al., 1999; MORGAN et al., 2000; FAYER et al., 2002; FAYER et al., 2004), acarretando na veiculação entre os mamíferos aquáticos, sendo observada a presença deste agente em focas, decorrente da contaminação fecal de águas marinhas (OLSON et al., 2004).

No que concerne à presença de mamíferos aquáticos mantidos em cativeiro no Brasil, surge a preocupação frente à qualidade da água de piscinas e oceanários, haja visto, que em virtude das características dos oocistos, mesmo com o tratamento a base de cloro utilizado em alguns parques, este agente foi encontrado (CAUSER et al., 2006).

Além disto, a oferta de diferentes itens alimentares, como legumes, verduras, frutas, algas marinhas, fanerógamas e peixes para as diversas espécies de mamíferos aquáticos cativos, podem constituir como fonte de infecção, pois em diversas pesquisas, vem sendo relatada à veiculação de oocistos de *Cryptosporidium* através de tais alimentos, seja decorrente da contaminação em sua origem ou após o processo de manipulação (MONGE & ARIAS, 1996; ORTEGA et al., 1997).

## 8.8 Sinais Clínicos

Entre os mamíferos aquáticos, boa parte dos relatos de *Cryptosporidium* spp. foi proveniente de material coletado de animais em vida livre (BORGES et al., 2006) ou “*post-mortem*” (HUGHES-HANKS et al., 2005), desta forma, o número de constatações no que diz respeito as manifestações clínicas nestas espécies, ainda é escasso. No entanto, Hill et al. (1997) observaram em um dugongo, sinais de anorexia, acentuada letargia com natação lenta em águas rasas, sendo este animal considerado em estágio terminal. Constatações semelhantes foram relatadas por Borges et al. (2005) ao observarem em um peixe-boi marinho a perda de peso, diarreia, desconforto abdominal e letargia.

Os sinais clínicos presentes nas duas espécies de Sirênios, são semelhantes aos transtornos descritos em outros mamíferos terrestres, nos quais foram observados quadros de diarreia aquosa, anorexia, perda de peso, dores abdominais e desidratação (LALLO, 1996). Na dependência de fatores como a idade dos animais e o estado imunológico do hospedeiro, a infecção pode variar de subclínica a severa, sendo os animais jovens geralmente mais susceptíveis à infecção com manifestações mais severa da doença (LALLO, 1996). Olson et al. (2004) mencionaram a susceptibilidade de focas infectadas pelo coccídio a inanição, predação e/ou a adquirir outros agentes, sendo estas observações pertinentes aos demais mamíferos aquáticos.

Contudo vale ressaltar que, durante estudos envolvendo as populações de peixes-boi marinhos e amazônicos no Brasil (BORGES et al., 2006), nem todos os animais diagnosticados com a infecção por *Cryptosporidium* spp., possuía evidências de manifestações clínicas, o que sugere a presença destes como portadores assintomáticos.

## 8.9 Diagnóstico

De acordo com Vasquez et al. (1986), não existe unanimidade para recomendar uma técnica como sendo a melhor no diagnóstico da criptosporidiose, porém vale ressaltar, que inúmeros métodos vêm sendo utilizados em diversas espécies terrestres, tais como flutuação centrifugada em solução açucarada de Sheather, coloração por safranina azul de metileno (MUNDIM et al., 1995), auramine-fenol (CASEMORE et al., 1984), ELISA (ROBERT et al., 1990), os quais também podem ser empregados em mamíferos aquáticos, de maneira a avaliar sua eficiência.

Em estudos direcionados aos hospedeiros aquáticos, na análise das amostras fecais de peixes-boi marinhos e amazônicos, foi utilizada a técnica de sedimentação pelo formol-éter com posterior confecção dos esfregaços, sendo a coloração de Ziehl-Neelsen modificada (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981) utilizada por Marcondes et al. (2002) e o método de Kinyon (BRASIL, 1996) empregado por Borges et al. (2006). Além destas, a coloração pelo 4'6'-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) foi utilizado para confirmar o diagnóstico de *Cryptosporidium* nos peixes-boi marinhos (BORGES et al., 2005).

Entre as pesquisas realizadas em mamíferos aquáticos, a imunofluorescência direta foi a técnica utilizada com a maior frequência (OLSON et al., 1997; FAYER et al., 2005). Contudo, conforme já constatado em pesquisas com mamíferos terrestres, o diagnóstico de criptosporidiose pela microscopia de luz demanda tempo e experiência do investigador para identificar de maneira precisa os oocistos (LALLO & BONDAN, 2006; DALL'OLIO & FRANCO, 2004).

Desta forma, métodos de detecção com maior sensibilidade vêm aos poucos sendo empregados, dentre eles a reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme a sua utilização em dugongo (MORGAN et al., 2000) e golfinho-fliper (FAYER et al., 2005), sendo salientado a importância desta técnica em pesquisas com mamíferos aquáticos (HUGHES-HANKS et al., 2005), de maneira a estabelecer uma possível relação com a saúde pública.

## 8.10 Tratamento

Até o presente, nenhum protocolo terapêutico foi descrito na utilização de infecções de *Cryptosporidium* spp. em mamíferos aquáticos. No entanto, os resultados mais expressivos entre os mamíferos terrestres, foram alcançados através da utilização

do paramomicina e o nitazoxanide, sendo o primeiro um antimicrobiano que reduz a excreção de oocistos (STEINER et al., 1997) enquanto que o segundo tem ação antiprotozoária (ABAZA et al., 1998).

Além destes fármacos, a reposição eletrolítica e o suporte nutricional são recomendados como parte do tratamento (CAREY et al., 2004), com possibilidades ainda de estratégias terapêuticas promissoras como a utilização do colostro bovino hiperimune anti-*C. parvum* (ABREU et al., 2003).

### **8.11 Medidas de Prevenção e Controle**

Considerado um coccídio resistente (CAREY et al., 2004), os oocistos de *Cryptosporidium* spp. apresentam características que favorecem a sua rápida dispersão no ambiente, tais como a capacidade de suportar a ação dos desinfetantes comumente utilizados (formoldeído, fenol, etanol, lisol), a possibilidade de atravessar determinados sistemas de filtração de água em decorrência do seu tamanho reduzido, a capacidade de flutuar, a permanência no ambiente durante algumas semanas ou meses e a tolerância em determinadas temperaturas e salinidade (FAYER et al., 2004).

Em virtude da abrangência do ambiente aquático aliado à ampla distribuição das diferentes espécies presentes em águas brasileiras, tornam as medidas de controle do *Cryptosporidium* limitadas. Sendo assim, para minimizar os riscos inerentes à disseminação da criptosporidiose entre as populações de mamíferos aquáticos de vida livre, torna-se de fundamental importância o controle ambiental, através da adoção de práticas agrícolas para prevenir a poluição de rios por excretas de animais (GRACZYK et al., 2000), bem como o incentivo à adequação das estruturas de saneamento, a proteção dos mananciais, educação e orientação sobre descargas de resíduos por embarcações durante atividades náuticas.

No que concerne às medidas de controle dos mamíferos aquáticos cativos, de maneira a minimizar ou eliminar os riscos inerentes à disseminação do coccídio, diversas pesquisas devem ser adotadas. A ausência de métodos de tratamento da água em grande parte das Instituições onde são mantidos estes animais, bem como às limitações da cloração utilizadas no tratamento por algumas Instituições, aumenta os riscos através da transmissão hídrica. Sendo assim, entre os métodos de inativação recomendado, verifica-se a necessidade de avaliação constante no sistema de filtração, bem como a utilização do ozônio ou a instalação de um sistema ultravioleta nos

oceanários e piscinas (CLANCY et al., 2000; KANJO et al., 2000; CAUSER et al., 2006). Além das medidas citadas, deve-se ainda evitar a presença dos oocistos nos alimentos ofertados e incentivar normas de higiene pessoal entre os tratadores e técnicos envolvidos na manejo dos animais.

### **8.12 Repercussão na Saúde Pública**

A contaminação de oocistos de *C. parvum* e *C. hominis* em águas superficiais ou de abastecimento público, assume um papel importante no comprometimento ambiental e na saúde pública (CAREY et al., 2004), haja visto que inúmeros casos já foram registrados em diferentes países (FUENTE et al., 1999; LAUBACH et al., 2004), inclusive no Brasil (BARALDI et al., 1999; HELLER et al., 2004).

Alguns estudos revelaram a diversidade genética do *Cryptosporidium* spp., e sugerem que a adaptação no hospedeiro e a relação hospedeiro-parasita co-evoluíram contribuindo para a quantidade da heterogeneidade genética deste coccídio (XIAO et al., 2002).

Desta maneira, após as constatações de Morgan et al. (2000), onde foi identificado a presença de *Cryptosporidium hominis* acometendo dugongo, desperta a atenção para a possibilidade destes animais atuarem como reservatórios do coccídio, e segundo Hughes-Hanks et al. (2005) estes achados sugerem uma antropozoonose. De acordo com Buck & Schroeder (1990), a ocorrência de zoonoses provenientes dos mamíferos aquáticos não é novidade, porém somente nas últimas décadas começou-se a apreciar o potencial para a transmissão de doenças destes animais para o homem.

Antigamente, grande parte das pessoas que contraíam doenças decorrentes da interação com mamíferos aquáticos pertenciam a populações isoladas de caçadores, porém atualmente os hospedeiros humanos destas zoonoses, em muitas ocasiões são profissionais ligados a centros de reabilitação ou oceanários, os quais são diariamente expostos ao risco de infecção (BUCK & SCHROEDER, 1990).

Segundo Borges et al. (2006) a presença de *Cryptosporidium* spp. em peixes-boi amazônicos, representa um risco direto para a possibilidade de disseminação do agente para outros peixes-boi, para as demais espécies que utilizam os recursos hídricos da região e para a população humana, seja em momentos de recreação ou pelo consumo inadequado da água.

### 8.13 Considerações Finais

As normas para manutenção de mamíferos aquáticos no Brasil são descritas pela Instrução Normativa (IN) Nº 3, de 8 de fevereiro de 2002, elaborada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis (IBAMA), onde estabelece a necessidade da avaliação dos parâmetros físico-químico e microbiológico da água dos recintos. Diante da possibilidade de veiculação hídrica do *Cryptosporidium* spp., torna-se oportuno, incluir a pesquisa deste coccídio entre as diretrizes recomendadas por esta normativa.

Muitos estudos epidemiológicos vêm sendo desenvolvidos focando diferentes espécies de mamíferos terrestres, no entanto poucos esforços de investigação têm sido direcionados para estudar populações de mamíferos aquáticos. A possibilidade de ocorrência de *Cryptosporidium* spp. sem manifestações clínicas evidentes, reforça a necessidade de monitoramento constante destas populações, através da realização de exames laboratoriais, sobretudo em populações cativas, pois a adoção de medidas de controle do agente favorecerá a reabilitação e manutenção destes espécimes, além de evitar a disseminação dos oocistos para o ambiente através de animais destinados aos programas de reintrodução.

A presença deste parasito nos mananciais aquáticos, pode ser considerada como um indicador da qualidade ambiental, gerando subsídios para apontar os impactos negativos da infecção humana ou animal, para a vida aquática.

No intuito de elucidar fatores epidemiológicos, surge a necessidade de caracterização genética do agente, de maneira a verificar se existe uma especificidade de hospedeiros aquáticos ou trata-se de oocistos do coccídio provenientes de outras espécies terrestres, através das diversas fontes de disseminação, pois somente algumas variantes destes protozoário desencadeiam a infecção e apresentam um potencial zoonótico de transmissão.

## 8.14 Referências

ABAZA, H. et al. Nitazoxanide in the treatment of Patients with intestinal Protozoan and Helminthic Infections: a report n 546 patients in Egypt. **Current Therapeutic Research**, Bridgewater, v. 59, n. 2, p. 116-121, 1998.

ABREU, V. J. S. et al. Avaliação da eficácia do colostro do colostro bovino hiperimune na infecção experimental de roedores com *Cryptosporidium parvum*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, p. 191-198, 2003.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJA-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnarii* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International Journal for Parasitology**, Oxford, n. 32, p. 1007-1021, 2002.

BARALDI, S. R.; MARQUES, E. G. L.; DIAS, R. M. D. S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na região de Campinas, SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 97-103, 1999.

BEST, R. C. *Inia geoffrensis*. **Mammalian Species**, v. 426, p. 1-8, 1993.

BORGES, J. C. G. et al. *Cryptosporidium* spp em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) cativo no Centro Mamíferos Aquáticos, Ilha de Itamaracá, no estado de Pernambuco. In: CONGRESSO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA, 1. **Resumos**, Guarapari, 2005.

BORGES, J. C. G. et al. Infecção por *Cryptosporidium* spp.: uma ameaça à conservação dos peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus manatus*) e amazônicos (*Trichechus inunguis*). In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE NA AMAZÔNIA E AMÉRICA LATINA, 7., **Resumos**, Ilhéus, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Infecções oportunistas por parasitas em AIDS:** técnicas de diagnóstico. Brasília, DF. 1996, 27p.

BUCK, C. D.; SCHROEDER, J. P. Public Helth Significance of Marine Mammal Disease. In: DIERAUF, L. A. (ed). **CRC Handbook of marine mammal medicine:** health, disease and rehabilitation. Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 163-173.

BUTLER, B. J.; MAYFIELD, C. I. *Cryptosporidium* spp. – **A review of the organism, the disease, and implications for managing water resources.** Waterloo. Ontário: Centre for Groundwater Research Waterloo, 1996.

CÂMARA, I. G.; PALAZZO JÚNIOR, J. T. Novas informações sobre a presença de *Eubalaena australis* no sul do Brasil. In: REUNIÃO DE TRABALHO DE ESPECIALISTAS EM MAMÍFEROS AQUÁTICOS DA AMÉRICA DO SUL, 1, **Resumos.** Buenos Aires, p. 35-41, 1984.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, New York, v. 38, p. 818-862, 2004.

CASEMORE, D. P. et al. Screening for *Cryptosporidium* in stools. **The Lancet**, London, v. 1, n. 8379, p. 734-735, 1984.

CAUSER, L. M.; et al. An outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection at an Illinois recreational waterpark. **Epidemiology and Infective.**, v. 134, p. 147-156, 2006.

CIMARDI, A. V. **Mamíferos de Santa Catarina.** Florianópolis: Fundação do Meio Ambiente, 1996, 302 p.

CLANCY, J. L. Using UV to inactivate *Cryptosporidium*. **Journal of the American Water Works Association**, v. 92, p. 97-104, 2000.

CURRENT, W. L. Human cryptosporidiosis. **The New England Journal of Medicine**, Waltham , v. 309, p. 614-615, 1983.

DALL'OLIO, A. J.; FRANCO, R. M. B. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em pequenos mamíferos silvestres de três áreas serranas do Sudeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 25-31, 2004.

DA SILVA, V. M. F. **Ecologia Alimentar dos Golfinhos da Amazônia**. 1984, 118 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – INPA – Universidade do Amazonas, Manaus.

DA SILVA, V. M. F.; MARTIN, A. R. A study of the boto, or Amazon river dolphin (*Inia geoffrensis*), in Mamirauá Reserve, BR: operation and techniques. In: REEVES, R. R.; SMITH, B. D.; KASAYA, T. (Ed) **Biology and conservation of freshwater cetaceans in Asia Occasional paper of the IUCN SSC**. n. 23, GLAND, SW: IUCN, 2000.

DENG, M.; PETERSON, R. P.; CLIVER, D. O. First findings of *Cryptosporidium* and *Giardia* in California sea lions (*Zalophus californianus*). **Journal of Parasitology**, Kan, v. 86, p. 490-494, 2000.

DI BENEDITTO, A. P. M. **Guia para estudo de Cetáceos: Interações com atividades de pesca**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, v. 1, 33 p., 2004.

DONNELLY, J. K.; STENTIFORD, E. I. The cryptosporidium problem in water and food supplies. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologic**, v. 30, p. 111-120, 1997.

DUBEY, J. P. et al. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis* – like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**. 116, 275-296, 2003.

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 11, p. 531-536, 2004.

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

FAYER, R. et al. Prevalence of zoonotic Protozoa Infecting Bottlenose Dolphins. **Synopsis of Research Meeting Bottlenose Dolphin Health & Risk**. Assessment Project, p. 56, 2005.

FAYER, R. et al. Temporal variability of *Cryptosporidium* in Chesapeake Bay. **Parasitology Research**, New York, v. 88, p. 998-1003, 2002.

FLORES, P. A. C. Preliminary results of a photoidentification study of the marine tucuxi *Sotalia fluviatilis* in southern Brazil. **Marine Mammal Science**, Lawrence, v. 15, n. 3, p. 840-847, 1999.

FREIRE-SANTOS, F. et al. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. **Journal Parasitology**, v. 86, p. 853-854, 2000.

FUENTE, R. de la. et al. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. **Veterinary of Parasitology**, Kan, v. 80, p. 179-185, 1999.

GELLIN, B. J.; SOAVE, R. Coccidian Infections in AIDS. Toxoplasmosis, cryptosporidiosis and isosporiasis. **Medical Clinics of North American**, v. 76, p. 205-234, 1992.

GRACZYK, T. K. et al. Environmental and geographical factors contributing to watershed contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Environmental Research**, v. 82, n. 3, p. 263-271, 2000.

GRACZYK, T. C. et al. *Giardia duodenalis* cysts of genotype a recovered from clams in the Chesapeake Bay subestuary, Rhode River. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 61, p. 526-529, 1999.

HELLER, L. et al. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 13, n. 2, p. 79-92, 2004.

HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. L. Satining of *Cryptosporidium* by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinária Scandinaria Supplement**, Compenhagem, v. 22, p. 594-596, 1981.

HILL, B. D.; FRASER, I. R.; PRIOR, H. C. *Cryptosporidium* infection in a dugong (*Dugong dugon*). **Australia Veterinary Journal**. Brunswich, v. 75, n. 9, p. 670-671, 1997.

HUGHES-HANKS, J. M. et al. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. In Five Marine Species. **Journal Parasitology**, Kan, v. 91, n. 5, p. 1255-1228, 2005.

IBAMA. **Protocolo de conduta para encalhe de mamíferos aquáticos**. Rede de Encalhes de Mamíferos Aquáticos do Nordeste, Recife, 298 p., 2005.

IBAMA. **Mamíferos aquáticos do Brasil: plano de ação**. Versão II, Edições IBAMA, Brasília, Brasil. 2001, 61 p.

KANJO, Y. et al. Inactivation of *Cryptosporidium* spp. Oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by in vitro excystation and animal infectivity. **Water Science Technology**, Oxford, v. 41, p. 119-125, 2000.

LABERGE, I.; GRIFFITHS, M. W.; GRIFFITHS, M. W. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.31, p. 1-26, 1996.

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

LALLO, M. A.; BONDAN, E. F. Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães de Instituições da cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 120-5, 2006.

LAUBACH, H. E. et al. A Study of Risk Factors Associated with the Prevalence of *Cryptosporidium* in Villages Around Lake Atitlan, Guatemala. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 8, n.4, p. 319-323, 2004..

LEVINE, N. D. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). **Journal Protozoology**. México, v. 31, p. 94-98, 1984.

LIMA, R. P. **Peixe-Boi Marinho (*Trichechus manatus*): Distribuição, status de conservação e aspectos tradicionais ao longo do litoral nordeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica). 1997, 80 f. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LUNA, F. O. **Distribuição, status de conservação e aspectos tradicionais do Peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) no litoral norte do Brasil**. 2001. 121 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MACHADO, E. C. L. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife/PE**. 2006. 141 f. Dissertação (Doutorado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MARCONDES, M. C. C. et al. *Cryptosporidium* sp in Antillean Manatees (*Trichechus manatus manatus*) in natural captivity, Paraíba state, Brazil. **Florida Marine Mammal Health Conference**, Gainesville. 2002. Disponível em: <<http://www.vetmed.utl.edu>>, Acesso em 29 jul 2002.

MONGE, L.; ARIAS, M. L. Presencia de microorganismos patógenos em hortaliças de consumo cru em Costa Rica. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 46, n. 4, p. 292-294, 1996.

MORGAN, U. M. et al. Detection of the *Cryptosporidium parvum* “Human” Genotype in a Dugong (*Dugong dugon*). **Journal of Parasitology**, Kan, v. 86, p. 1352-1354, 2000.

MULLER, A. N. B. **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo.** 1999. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

MUNDIM, M. J. S. et al. Frequência de Oocistos de *Cryptosporidium* sp. em Fezes de Bezerros criados sob condições naturais no município de Uberlândia, analisadas por quatro métodos laboratoriais. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 1, n. 1, p. 33-36, 1995.

OLSON, M. E. et al. Giardiasis in ringed seals from the western Arctic . **Journal Wildlife Disease**, Ames, v. 33, p. 646-648, 1997.

OLSON, M. E.; APPELBEE, A.; MEASURES, L. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in pinnipeds. In: FAYER, R.; LINDSAY, D. Zoonotic protozoa in the marine environment: a threat to aquatic mammals and public health. **Veterinary Parasitology**, Kan, v. 125, p. 131-135, 2004.

O'DONOGHUE, P. J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal Parasitology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 139-95, 1995.

ORTEGA, Y. R. et al. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayentanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 57, n. 6, p. 683-686, 1997.

PARENTE, C. L.; ARAUJO, M. E. Is the diversity of cetaceans in Brazil reduced by the intensification of the seismic surveys? **Report to the International Whaling Commission Scientific Committee**, SC/57/E6. 15p, 2005.

PÉREZ, I. J. **Los manatíes del río San Juan y los canales de Tortuguero: ecología y conservación.** Araucaia: Ed. Managua, 2003.

RECTOR, A. et al. Characterization of a novel Close-to-Root Papillomavirus from a Florida Manatee by Using Multiply Primed Rolling-Circle Amplification *Trichechus*

*manatus manatus* Papillomavirus Type 1. **Journal of Virology**, v. 78, n. 22, p. 12698-12702, 2004.

ROBERT, B. et al. Diagnosis of bovine cryptosporidiosis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary for Parasitology**. Kan, v. 37, p. 1-8, 1990.

ROSAS, F. C. W. Peixe-Boi da Amazônia *Trichechus inunguis* (Natterer, 1883). Pp. 178-181, in: H. L. Cappozzo & M. Junin (eds). Estado de Conservação de los Mamíferos Marinos del Atlántico Sudoccidental. **Informes y estúdios del Programa de Mares Regionales, del Programa de las Naciones Unidas para el Médio Ambiente** (UNEP), n. 138, 250 p., 1991.

ROSAS, F. C. W.; LETHI, K. K. Nutritional and mercury content of milk of the Amazon River e Dolphin, *Inia geoffrensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Elmsford, v. 115 A, p. 117-119, 1996.

SALVIN, D. *Cryptosporidium* spp. Meleagridis (sp. nov). **Journal Company of Pathology**, v. 65, p. 262-266, 1955.

SANTÍN, M.; DIXON, B. R.; FAYER, R. Genetic Characterization of *Cryptosporidium* Isolates From Ringed Seals (*Phoca hispida*) in Northern Québec, Canada. **Journal of Parasitology**, Kan, v. 91, n. 3, p. 712-716, 2005.

SIMÕES-LOPES, P. C. O luar do delfim: a maravilhosa aventura da história natural. Ed. Letradágua, 2005.

SMITH, J. L. *Cryptosporidium* spp. And Giardia as Agents of Foodborne Disease. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 56, n. 5, p. 451-461, 1993.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne Cryptosporidiosis: Current status. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 14, p. 14-22, 1998.

STEINER, T. S.; THIELMAN, N. M.; GUERRANT, R. L. Protozoal Agents: what are the dangers for the public water supply? **Annual Review of Medicine**, v. 48, p. 329-340, 1997.

TAMBURRINI, A.; POZIO, E. Long term survival of *Cryptosporidium* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal Parasitology**, v. 29, p. 711-715, 1999.

TYZZER, E. E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Arch Protistenkd**, v. 26, p. 394-412, 1912.

VASQUEZ, I. H. G.; RESTREPO, M. I.; BOTERO, D.; Cryptosporidiosis. **Biomédica**. Bogotá, v. 6, n. 12, p. 48-70, 1986.

VERGARA-PARENTE, J. E. et al. Salmonellosis in an Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) calf: a fatal case. **Aquatic Mammals**, St. Andrews, v. 29, n. 1, p. 131-136, 2003.

XIAO, L. et al. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.

XIAO, L. et al. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 1773-1785, 2002.

XIAO, L. et al. Species and Strain-specific Typing of *Cryptosporidium* Parasites in Clinical and Environmental Samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 93, n. 5, p. 687-692, 1998.

## 9. CONCLUSÕES GERAIS

A) Esta é a primeira ocorrência de *Cryptosporidium* spp. acometendo os peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus*) mantidos em oceanários;

B) A presença do animal infectado com outros peixes-boi cativos pode favorecer a disseminação desta enfermidade, o que torna oportuno a realização de exames laboratoriais em todos os animais cativos, com ou sem sinais clínicos;

C) Este fato representa riscos para a saúde pública, visto a rotina de manejo existente dos peixes-boi cativos executadas pela equipe técnica e tratadores;

D) Este é o primeiro relato de *Cryptosporidium* spp. acometendo os peixes-boi amazônicos (*Trichechus inunguis*) e sua constatação constitui uma maneira indireta de avaliar a qualidade dos recursos hídricos e o envolvimento com a saúde pública;

D) A infecção por *Cryptosporidium* spp. foi constatada em peixes-boi amazônicos e peixes-boi marinhos, sendo observado que os animais cativos desta última espécie apresentam grande possibilidade de infectar-se pelo coccídio e posteriormente eliminar oocistos, acarretando na disseminação da enfermidade;

F) O caráter zoonótico da criptosporidiose associado aos achados deste trabalho aponta para uma necessidade de novos esforços de investigação, visando avaliar os aspectos epidemiológicos envolvidos na disseminação deste parasito;

G) A presença dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ponto de captação (praia) representa o primeiro relato deste coccídio em águas marinhas costeiras no Brasil;

H) Os peixes-boi marinhos mantidos em cativeiro, encontram-se expostos ao risco de infecção, tendo em vista, a contaminação por *Cryptosporidium* spp. em sua origem, ou seja, nas áreas marinhas costeiras onde vem sendo realizado a captação da água que abastece as piscinas;

I) Os métodos de tratamento físico-químico empregados na água das piscinas destinadas a manutenção dos peixes-boi marinhos, não são adequados para promover a remoção e/ou inativação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp.

J) A presença de humanos com a infecção por *Cryptosporidium* spp. pode constituir como meio de veiculação dos oocistos aos peixes-boi marinhos, através do contato realizado nas atividades de manejo. De maneira semelhante, os animais infectados representam implicações para a saúde pública, pois podem disseminar oocistos e vir a desencadear a infecção nos funcionários, constituindo assim, como um novo reservatório para este agente.