

CONTROLE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PARASITÁRIA EM ÁREAS DE RECREAÇÃO

MICROBIOLOGICAL AND PARASITOLOGICAL QUALITY CONTROL OF RECREATION AREAS

CONTROL DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y PARASITOLÓGICA DE LAS ÁREAS DE RECREACIÓN

Adriana Sotero-Martins¹, Antonio Nascimento Duarte²; Elvira Carvajal³; Maria Inez de Moura Sarquis⁴; Ormeizinda Celeste Cristo Fernandes⁵

RESUMO

As áreas de recreação são constituídas por matrizes ambientais de contato primário com a população (água e areia) por isso precisam ser monitoradas periodicamente, pois podem ser encontrados microrganismos patogênicos que oferecem riscos à saúde humana e animal. No Brasil, há descrito na resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) os limites padrões aceitáveis para coliformes encontrados na matriz água utilizada para balneabilidade, o mesmo não ocorre para areia. Apenas iniciativas isoladas de órgãos ambientais municipais estabeleceram limites de classificação para a matriz areia, levando-se em conta parâmetros

bacteriológicos. Estudos científicos que possam embasar outros bioindicadores de condições sanitárias estão sendo realizados no Brasil, sendo proposto os fungos e parasitas na avaliação da qualidade sanitária das áreas de recreação, como: praias, parques, quadras de jogos e creches. Este trabalho teve como objetivo abordar tópicos críticos da área de saneamento ambiental, tais como: uso da água e da areia nos ambientes de recreação; bioindicadores e riscos associados à saúde; doenças causadas por exposição a matrizes ambientais contaminadas. E indicar a importância do uso de múltiplos parâmetros como limites nas normativas legais que embasam a fiscalização, para assegurar o monitoramento mais completo e dar suporte as ações dos órgãos de controle ambiental e de saúde.

Descritores: qualidade sanitária; áreas de recreação; coliformes; parasitas; bioindicadores.

ABSTRACT

The recreation areas are composed of primary contact population environmental

¹ Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental (DSSA), área de Saneamento e Saúde Ambiental; Biologia Molecular e Biossegurança. E-mail: adrianasotero@ensp.fiocruz.br

² Biólogo;Doutor em ciências;Pesquisador titular em saúde pública na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), ENSP/DCB.E-mail: duarte@ensp.fiocruz.br

³ Bióloga,Doutora em ciências;Professora na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) – IBRAG - DBC.E-mail: elvcarvajal@hotmail.com

⁴ Bióloga,Doutora em ciências, Pesquisadora titular em saúde pública na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), IOC - LTBBF.E-mail: isarquis@ioc.fiocruz.br

⁵ Doutora em ciências;Pesquisadora titular em saúde pública na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), ILM - LBS.E-mail: oferandes@amazonia.fiocruz.br

matrices (water and sand), this should be periodically monitored to detected pathogens that cause risks to human and animal health. In Brazil the acceptable limits standards are described in resolution by National Environmental Council (CONAMA) for coliforms present in bathing water, but not exist to sand matrix. Only isolated initiatives of municipal environmental agencies have established limits for the classification of sand matrix, based on only bacteriological parameters. Brazilian scientific studies may support others biomarkers of health conditions to evaluate the sanitary quality, like fungi and parasites, that can be used to recreation areas such as beaches, parks, day care centers and block of games. This study aimed to develop critical topics in the area of environmental sanitation: use of water and sand in recreation environments; biomarkers associated with health risks; diseases caused by exposure to contaminated environmental matrices. And indicate the use of multiples limits parameters described in rules to secure the most complete monitoring and support the actions of environmental control and health agencies.

Descriptors: sanitary quality; recreation areas; coliforms; parasites; bioindicadores

RESUMEN

Las áreas de recreación están compuestas de matrices ambientales de contrato ambiental

con la población (agua y arena) por lo que debe controlarse periódicamente ya que se pueden encontrar los patógenos que representan un riesgo para la salud humana y animal. En Brasil, se describen en la resolución del Consejo Nacional de Medio Ambiente (CONAMA) los límites padrones aceptables para coliformes que se encuentran en la matriz agua utilizada para bañarse, lo mismo no ocurre para la arena. Sólo iniciativas aisladas de los organismos ambientales municipales han establecido límites para la clasificación de matriz arena, teniendo en cuenta los parámetros bacteriológicos. Los estudios científicos que puedan apoyar otros biomarcadores de las condiciones de salud se están llevando a cabo em Brasil, siendo propuestos hongos y parásitos en la evaluación de la calidad sanitaria de las áreas recreativas tales como playas, parques, círculos infantiles y bloques de juegos. Este estudio tuvo como objetivo desarrollar a través de los puntos de presentación críticos en materia de saneamiento ambiental, el uso de agua y arena en ambientes de recreación; biomarcadores y riessos asociados a la salud; a enfermedades causadas por la exposición a matrices ambientales contaminadas. Y indican la presencia de múltiples parámetros límites descritos en los normativos para garantizar el control más completo y apoyar las acciones

de los organismos de control del ambiente y la salud.

Descriptor: calidad sanitária; áreas de recreación; coliformes; parasitos; bioindicadores

SANEAMENTO AMBIENTAL

O conceito clássico de saneamento básico refere-se à implantação de barreiras sanitárias para evitar o contato entre o agente causal e o hospedeiro, como definido no Plano Nacional de Saneamento (PLANASA). Esse plano, embora tenha relevância não conseguiu garantir a solução para grandes problemas de saneamento, devido à dissociação entre os diferentes componentes, como por exemplo, da coleta e do tratamento de esgoto. A evolução desse conceito está no saneamento ambiental, entendido como uma estratégia que visa à melhoria da qualidade de vida e do perfil de saúde da população, e das condições ambientais da bacia hidrográfica inserida. Esse novo conceito integra a gestão ambiental (de recursos hídricos e de saneamento), como integrantes de uma mesma política¹. Sendo o saneamento ambiental considerado como pré-requisito para a urbanização, pois o cotidiano da população é diretamente influenciado pelas condições da oferta dos serviços de saneamento, pelo conforto representado pela disponibilidade de água nas residências, pela coleta e pelo tratamento do esgoto, lixo, do

manejo das águas fluviais, pela segurança contra cheias, etc.

Problemas decorrentes da falta de infra-estrutura sanitária, principalmente nas grandes cidades, agravam problemas como: processos erosivos, aumento do escoamento superficial e inundações, que se tornam mais evidentes nas margens dos rios, ocasionando diversos problemas às pessoas residentes nessas áreas. As políticas adotadas pelos governos no âmbito nacional e regional, através das leis, não dão conta da complexidade das causas e fatores que geram esses problemas socioambientais e, acabam refletindo diretamente na poluição dos recursos hídricos, onde a degradação é mais visível². Um exemplo disso é o que ocorre no Brasil, na cidade de Manaus, rodeada por floresta. As grandes empresas, que se instalaram no pólo industrial, receberam incentivos do Estado para sua implantação principalmente na década de 1960. Esse fato associado às políticas públicas nacionais e regionais para o desenvolvimento econômico da região Norte não considerou a degradação socioambiental (recursos naturais e população) que viria junto com essas medidas. Consoante a isto se verifica nessa microbacia, *in locus*, que 100% do esgoto sanitário das casas são lançados em igarapés, fato esse reconhecido por 97% da população de Manaus. Outro fator agravante é o indicador social que mostra que 67% da

população são trabalhadores autônomos, que desenvolvem atividades informais, 36% possuem nível de escolaridade em ensino fundamental e 7% analfabetos. Em função dessas limitações são obrigados a ocuparem as áreas menos valorizadas e degradadas, como as margens dos igarapés. Além disso, 17% do lixo é lançado diretamente nos igarapés, ocasionando assoreamento e erosões, que mudam a dinâmica hidrológica da microbacia da cidade Manaus³.

As carências de infraestrutura sanitária no Brasil resultam em fontes de poluição concentrada, que ocasionam à deteriorização da água e do solo. A interface entre saneamento e recursos hídricos é estreita, pois os mananciais de fonte de água potável tornam-se vulneráveis à contaminação, assim como a saúde da população. Como esses ambientes degradados podem ser usados como área de recreação, o risco para a saúde humana é aumentado. A busca de soluções sustentadas em inovações que envolvam a transversalidade do setor de saneamento básico, voltada para as demandas de melhoria de águas de qualidade, de coleta e de tratamento de esgotos domésticos, de soluções para disposição de esgotos e de manejo de resíduos sólidos; implementação de sistemas de reuso de água, minimização do lançamento de resíduos no meio ambiente, rivalizados de forma adequada à saúde pública e à proteção do ambiente².

A política nacional de recursos hídricos brasileiros aponta para caminhos que indicam graves falhas na aplicabilidade da lei por parte dos órgãos ambientais, aspecto que de certa forma exerce influências negativas no planejamento dessas áreas, em especial nas áreas de proteção permanentes (APPs) em perímetro urbano. As políticas públicas têm papel vital nessa perspectiva e a função deste diagnóstico é propor o uso da microbacia como célula de análise ambiental, onde os governos possam ter um parâmetro real dos problemas existentes e a partir disso implantar projetos coerentes que evitem a degradação ambiental, hídrica e social dos moradores. Uma das alternativas condizentes com a realidade vigente em uma proposta de planejamento ambiental seria a inserção das Microbacias Hidrográficas como unidades de análise socioambiental onde estejam associados os agentes passivos (recursos naturais) e ativos (ação antrópica)².

Visando ações de controle estruturadas da qualidade sanitária da água e do solo utilizadas pela população em áreas de recreação, como praias, praças e campos, deve-se fornecer informações seguras sobre os riscos do uso desses ambientes, seja para balneabilidade ou recreação. É imprescindível ter investimentos para atender essas ações e ampliar o conhecimento científico em todos os aspectos relacionados direta ou indiretamente com o setor. São exemplos

dessas ações: definir critérios e indicadores específicos sobre a qualidade sanitária dos ecossistemas, definir padrões de comparação, metodologias seguras e possíveis de darem resposta rápidas aos sistemas de controle, dar cumprimento às normas de monitoramento de fiscalização dos órgãos oficiais competentes visando a redução de tais problemas.

- Uso da água

Todos os organismos vivos têm a água como principal constituinte. Mesmo assim, com o passar dos anos, o homem vem deteriorando a qualidade desse precioso recurso através de ações irresponsáveis e conseqüentemente ameaçando a integridade de sua própria espécie⁴. Ao redor do mundo, por toda a plataforma continental e inclusive em mar aberto, observa-se um crescimento das evidências da ação do homem, através da presença de fontes pontuais ou não, de poluição. A descarga de efluentes, trazendo ameaças como organismos patogênicos, que podem transmitir doenças por via oral, via alimentar ou através de vetores e do contato com a água altera a dinâmica dos ecossistemas, representando um grave risco à saúde. Juntamente com outros agentes de estresse, como os derivados de poluentes orgânicos ou não, que persistem em organismos e influenciam negativamente nos recursos aquáticos sobre a saúde humana. A concentração da população em áreas urbanas

e industriais aumenta virtualmente o consumo de água, tanto para abastecimento doméstico, quanto industrial e outras atividades, que tenham a água como recurso fundamental, e vincula as atividades humanas à disponibilidade de águas continentais⁵.

Em todo o mundo os ambientes aquáticos são utilizados das formas mais variadas, dentre as quais podemos destacar o abastecimento de água, a geração de energia, a irrigação, a navegação, a aquicultura, a harmonia paisagística, o abastecimento industrial, a dessedentação de animais, a preservação da fauna e da flora, recreação e lazer, e a diluição e transporte de despejos⁶.

Segundo Von Sperling⁶, o uso mais nobre da água é representado pelo abastecimento de água doméstico, o qual requer a satisfação de diversos critérios de qualidade. Igualmente importante, encontra-se a recreação ou lazer, devendo ser destacado como um dos usos mais nobres do ambiente aquático e, ao mesmo tempo, um dos menos lembrados, em nosso país. De acordo com o mesmo autor, ainda hoje, no que diz respeito à Engenharia Sanitária e Ambiental, pode-se observar uma carência na atenção dedicada ao uso da água para recreação, que constitui uma das mais antigas formas de apreciação desse recurso. A questão da balneabilidade das águas ainda é muito restrita, contemplando apenas o monitoramento das praias em regiões litorâneas onde a concentração de

banhistas é mais intensa. Além disso, o monitoramento é muito limitado, ou quase inexistente em águas doces, onde o direito dos habitantes ao contato com a água de qualidade é o mesmo.

Devido à ação antrópica, a pequena parcela de água disponível em nosso planeta para consumo vem sendo lentamente reduzida. O crescimento populacional somado ao mau uso e gerenciamento dos recursos e resíduos vem destruindo corpos hídricos. Podemos tomar como exemplos os lançamentos de rejeitos e seu tratamento inadequado, que extrapolam a capacidade de autodepuração do ambiente e expõe a população a sérios riscos à saúde. Tal condição torna necessária uma mobilização na área ambiental e sanitária, que vise o desenvolvimento de tecnologias, conhecimentos e estratégias políticas para preservar a qualidade de vida da população⁷.

Em seu relatório de qualidade da água das praias litorâneas, do ano de 2009, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo⁸ ressalta que muitas capitais brasileiras se estabelecem a beira-mar. Mas normalmente a infraestrutura de saneamento não é suficiente, fazendo das praias um destino muito comum para os aportes de esgotos. Pode-se assim, dizer que a estrutura das cidades litorâneas tem influência direta sobre a qualidade de nossas águas costeiras. Outros fatores que podem influenciar na

balneabilidade das praias são sua fisiografia, a coleta e disposição final de resíduos sólidos e as operações de portos e marinas.

Organismos patogênicos causadores de doenças chegam ao meio ambiente quando os esgotos são lançados em corpos receptores sem tratamento prévio, assim como através das excretas de animais e seres humanos, lixo e sedimentos que são carreados pelas águas das chuvas. Ao alcançarem as praias, sejam oceânicas, de baía ou de rios, os corpos de água contaminados trazem consigo bactérias, vírus, fungos e parasitas, deixando seus frequentadores suscetíveis às doenças causadas por eles. Dentre os banhistas, crianças, idosos e pessoas com baixa resistência têm maior probabilidade de adquirirem infecções ou outras patologias após o contato com águas contaminadas. Sabe-se que do ponto de vista da saúde pública além das doenças comuns à veiculação hídrica, são importantes também, aquelas que ocorrem através de organismos patogênicos oportunistas e causam dermatoses⁸.

De acordo com Rouquayrol e Almeida Filho⁹, as doenças de veiculação hídrica são aquelas transmitidas ao homem, através da água. Os agentes patogênicos eliminados pelo homem em seus dejetos ou através de poluentes radioativos e químicos oriundos de efluentes industriais ou outros resíduos são transportados pela água e alcançam o homem

por diferentes vias. Entre essas vias estão à ingestão direta da água contaminada, o contato da mesma com a pele e mucosas e o seu uso na irrigação e preparo de alimentos. Como exemplos de doenças veiculadas pela ingestão, podemos citar as enteroinfecções em geral, febre tifóide, febre paratifóide, disenteria bacilar, disenteria amebiana, cólera, hepatite infecciosa, poliomielite e giardíase. Já aquelas veiculadas pelo contato com mucosas e pele seriam esquistossomose, infecções dos olhos, ouvidos, nariz e garganta e doenças de pele.

No Brasil, há instrumentos específicos para a avaliação da evolução da qualidade das águas, tanto nos principais rios, como em reservatórios, lagoas costeiras, baías e praias. Em relação aos níveis estabelecidos para balneabilidade, visando garantir condições seguras à recreação de contato primário, está em vigor a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Nº 274 de 29 de novembro de 2000. Através dessa Resolução, as águas são classificadas como próprias ou impróprias, a partir do resultado de análises microbiológicas, ou da detecção da presença de esgotos, óleos, graxas, maré vermelha, floração de algas tóxicas, incidência de doenças de veiculação hídrica ou outras que contraindiquem o contato primário¹⁰. O monitoramento das áreas de recreação normalmente é realizado mais intensamente nos meses de verão, sendo

permanente nas regiões onde o clima favorece o fluxo de banhistas durante todo o ano. A Resolução inclui os indicadores de contaminação fecal, como *Escherichia coli* e Enterococos, estabelecendo as quatro categorias para classificação das praias, de acordo com a densidade de coliformes totais ou fecais encontrada em análises realizadas por cinco semanas consecutivas. Contudo, através da análise dos padrões estabelecidos, não só na legislação brasileira, mas também na legislação internacional e descritos em estudos pertinentes ao tema, observa-se uma variação não só no critério de escolha do indicador utilizado para a realização do monitoramento da qualidade das águas, mas também na metodologia de realização das análises em laboratório. Tal variação tende a gerar divergências quanto aos resultados, quanto a sua precisão e sensibilidade, tornando difícil uma comparação criteriosa dos estudos e intervenções, portanto inovações nessa área de conhecimento são necessárias.

- Uso da areia

O CONAMA recomendou aos órgãos ambientais a avaliação da qualidade parasitológica e microbiológica da areia para futuras padronizações, por meio da Resolução nº. 274/00 no oitavo artigo, que classifica as águas em doces, salobras e salinas destinadas à balneabilidade. Por aquela ocasião, a

Secretaria Municipal de Meio Ambiente (SMAC) do Rio de Janeiro foi de vanguarda e editou a Resolução nº. 081/00. Contudo, esta tinha caráter provisório de dois anos e tratava apenas das condições bacteriológicas, não estabelecendo a análise para fungos e parasitas, assim como não estabelecia indicadores e os respectivos limites para esses microrganismos, os quais também são importantes patógenos de praias¹¹. Uma vez que muitas doenças de pele, infecções da unha e do couro cabeludo, alergias respiratórias e outros comprometimentos orgânicos estão associados a micoses e doenças parasitárias pelo contato com areia contaminada, com maior risco para crianças e idosos. Em 2010, a SMAC editou uma nova resolução N° 468, mas continuou sem realizar a avaliação das condições sanitárias quanto à presença de fungos, parasitas e vírus, como era esperado.

O Estado de São Paulo também estabeleceu uma legislação para esta matéria, através de um projeto de lei que foi aprovado pela Assembléia Legislativa Estadual no ano de 2008, contudo somente em 2011 é que virou lei, Lei Estadual 14.366 de 15 de março de 2011. Sendo responsabilidade pelo monitoramento das areias das praias do litoral, dos rios e represas do estado para ser desenvolvido pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). E no Paraná, também no ano de 2011 foi editado o projeto de lei No. 824, e hoje encontra-se em

curso o programa de limpeza e de emissão de boletins da qualidade da areia do litoral, pelo Instituto das Águas do Paraná da Secretaria Estadual de Meio Ambiente. Outros estados brasileiros que também estão caminhando em direção ao atendimento da resolução CONAMA, como o do Amazonas.

Na Europa, em 2002, a Associação Bandeira Azul da Europa¹⁴ estabeleceu valores limites para indicadores sanitários, como coliformes totais, *E. coli*, Enterococos intestinais, fungos, dermatófitos e leveduras. Para os indicadores micóticos, tomou como base os resultados obtidos em análises de areia de praias de diferentes níveis de ação antrópica do litoral de Portugal, e estabeleceu valores médios para os parâmetros selecionados. Enquanto para os indicadores bacteriológicos, utilizaram os mesmos limites aceitos para balneabilidade de água de praia, adaptados para areia. No período de 2001/2002, a Associação Bandeira Azul da Europa promoveu a realização do projeto “Qualidade Microbiológica de Areias de Praias Litorais”, orientado para o desenvolvimento de critérios científicos de caracterização da qualidade das areias das praias de Portugal, procurando-se testar indicadores e métodos de aferição da qualidade das areias¹⁵.

De acordo com Boukai¹⁵ não foram realizadas pesquisas de fungos patogênicos durante o monitoramento da qualidade

sanitária da areia das praias do Rio de Janeiro, no período que foi estabelecida a resolução 081/00 da SMAC. Segundo Sarquis e Oliveira¹⁶, poucas são as referências sobre a microbiota específica da orla litorânea brasileira. Apesar do órgão ambiental municipal do Rio de Janeiro ter sido de vanguarda na edição de normatizações de avaliação e monitoramento da qualidade sanitária das areias das praias. A edição da nova Resolução da SMAC nº 468 de 2010, esta foi baseada no trabalho de monitoramento realizado pela empresa terceirizada chamada Consultoria Estudos Projetos Ltda (Cohidro). Esta acompanhou por quatro anos a qualidade sanitária bacteriológica das areias de 23 praias do RJ sendo (10 de 35 pontos de coletas realizados nas praias e ilhas pertencentes à Baía de Guanabara) em moldes metodológicos semelhantes aos da antiga resolução, não sendo realizada a avaliação das condições sanitárias quanto à presença de fungos, parasitas e vírus, como era esperado. Portanto, a resolução ainda está incompleta do ponto de vista microbiológico, e há uma série de ressalvas para serem feitas pela comunidade científica, apesar do espaço temporal entre a antiga resolução e a nova, pois não foram incorporados metodologias e avanços científicos nesta área. Ressalta-se a importância de padrões nacionais, que deveriam ser editados pelo órgão superior

brasileiro, o CONAMA, como ocorre nos países europeus e nos Estados Unidos, que normatizam os padrões sanitários de avaliação da qualidade sanitária desses espaços de uso pela população.

BIOINDICADORES E RISCOS ASSOCIADOS

- Bioindicadores Fecais Utilizados em Análise de Água e Areia de Recreação:

Coliformes Totais

Os coliformes totais são bactérias do grupo coliforme, pertencentes à família Enterobacteriaceae, tendo como principais gêneros: Escherichia, Salmonella, Shigella, Citrobacter, Klebsiella e Enterobacter, Proteus, Serratia, embora vários outros gêneros pertençam ao grupo. Os coliformes são definidos como bastonetes Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não esporulados, oxidase-negativos, que fermentam lactose com formação de ácido e gás dentro de 24-48 h a $35,0 \pm 0,5$ °C, presentes nas fezes de animais homeotermos, indicando indiretamente a presença de fezes humanas¹⁷⁻¹⁸. Por essa razão, nas análises de diferentes matrizes ambientais (água, areia e sedimentos), eles constituem um dos parâmetros mais usados no mundo pelos órgãos ambientais, contudo mais recentemente alguns órgãos de

vigilância têm usado outros parâmetros associados. A principal metodologia de detecção ainda é pela técnica de tubos múltiplos, em que se usa, por exemplo, o Caldo Fluorocult LMX, da MERCK, ref. 1.106620 em que amostras previamente diluída ou não, são semeadas em condições assépticas e incubadas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 e 48h. A leitura é considerada positiva para coliforme total, quando, após incubação, aparece a cor azul esverdeada. Esta reação ocorre pela capacidade da enzima β -D-galactosidase em hidrolisar o substrato cromogênico (X-GAL), (5-bromo-6-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo), expressando os resultados em número mais provável (NMP), calculado, conforme American Public Health Association [APHA]¹⁹. Contudo, metodologias mais precisas foram descritas por outros autores²⁰⁻²² sendo os resultados descritos em unidade formadora de colônia (UFC).

Na avaliação da qualidade sanitária das praias de Portugal, com o propósito da aplicação dos padrões propostos por Mendes²³, indicaram os Enterococos, que são bactérias do grupo dos Streptococos fecais, se caracterizam pela alta tolerância às condições adversas de crescimento, tais como: capacidade de crescer na presença de 6,5 % de cloreto de sódio, a pH 9,6 e nas temperaturas de 10°C a 45°C . Sendo a maioria das espécies desse grupo de origem fecal

humana, embora possam ser isolados de fezes de animais, CONAMA em 2000, como um melhor bioindicador do que os coliformes totais e coliformes termotolerantes pesquisados. Corroborando com a U.S. Environmental Protection Agency (EPA), a qual publicou, em 1986, um relatório de qualidade de água em que recomenda dois organismos indicadores *Escherichia coli* e Enterococos²⁴. O Relatório concluiu que esses dois bioindicadores são melhores para prever a presença de microrganismo, que causam doenças gastrointestinais, do que os coliformes totais e coliformes termotolerantes, bioindicadores utilizados no passado para determinar a segurança das águas de recreio. De igual maneira, no Brasil, a Resolução CONAMA nº 274/2000 aboliu os coliformes totais dessa legislação e adicionou os mesmos indicadores americanos. Outras bactérias patogênicas e não patogênicas como *Campylobacter jejuni*; *Clostridium perfringens*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Shigella sp*; *Staphilococcus sp*; *Vibrio sp* foram referenciadas em estudos de qualidade sanitária de areia¹⁵.

Escherichia coli

A espécie bacteriana *Escherichia coli* pertencente à família Enterobacteriaceae, pode ser identificada e enumerada rapidamente em placas de isolamento ou em caldo, por diversas técnicas baseadas em substratos

enzimáticos cromogênicos e fluorogênicos ou ambos, que envolvem a capacidade de detecção da presença das enzimas específicas β -galactosidase e β -glicuronidase com o emprego de substrato apropriado como, por exemplo, os substratos: cromogênico ONPG (o-nitrofenil- β -D- galactopiranosídeo) que indica a presença de coliformes e o fluorogênico MUG (4- metil umbeliferil- β -D- glicuronídeo), que indica a presença de *Escherichia coli*, consumindo os carbonos do glucoronídeo e liberando quatro metil um beliferona, que tem fluorescência azul quando exposto à luz UV (360nm)²⁵. Essa espécie cresce em meio complexo a 44-45° C, fermentam lactose e manitol com produção de ácido e gás, produzindo indol a partir do aminoácido triptofano. São abundantes em fezes humanas e de animais, sendo somente encontradas em esgotos, efluentes, águas naturais e solos que tenham recebido contaminação fecal recente¹⁰. Sendo parte normal do intestino de humanos e animais de sangue quente, essas bactérias são carregadas por meio da água de esgoto doméstico, de lixo, vindo, portanto, a contaminar areia e água do mar, assim como outros microrganismos patogênicos²⁶. Contudo os padrões de balneabilidade, estabelecidos pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) nos Estados Unidos da América (EUA), somente recomendam a detecção de *Escherichia coli* para água doce¹⁹. Por outro lado, no Brasil, a

Resolução CONAMA nº 274/00 recomenda o parâmetro *E.coli* para avaliação da qualidade microbiológica de águas doces e salinas, e o parâmetro Enterococos que, nos EUA, é usado para avaliar a qualidade sanitária de ambas as águas; no Brasil, a adoção desse parâmetro se refere apenas a águas marinhas.

Fungos

A micologia é a ciência que estuda os fungos, e as doenças por eles produzidas são chamadas de micoses. São organismos com células eucarióticas, algumas espécies podem estar na forma de levedura (unicelular), outras, na forma de fungos filamentosos (pluricelular) e outras, ainda nas duas formas, que são as espécies dimórficas, que se desenvolvem dependendo das condições ambientais e do estresse encontrado. Muitos gêneros são oportunistas, podendo ser potencialmente patogênicos, crescem rapidamente, formando colônias maduras em quatro ou cinco dias, se tornando patógenos oportunistas. Esses são saprófitas, ou seja, vivem de matéria orgânica em decomposição no solo e às vezes se tornam aerotransportados. Como o ser humano inala constantemente os conídios - estruturas assexuadas reprodutivas imóveis - de fungos oportunistas, as culturas rotineiras de escarro e de outras secreções respiratórias podem revelar algumas colônias desses organismos,

e, como os conídios estão no ar, podem contaminar também a pele²⁷.

Os unicelulares - as leveduras são formadas por microrganismos unicelulares que cumprem as funções vegetativas e reprodutivas. As espécies *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* são as mais importantes leveduras causadoras de doenças humanas. A primeira espécie pode ser encontrada em fezes humanas e a segunda, em excrementos de pombos e outras aves, que, no entanto, não são infectados, por serem vetores dessa espécie para o ser. As leveduras são formadas por microrganismos unicelulares que cumprem as funções vegetativas e reprodutivas. As espécies *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* são as mais importantes leveduras causadoras de doenças humanas, elas podem ser encontradas nas fezes humanas, e a segunda espécie pode ainda ser encontrada em excrementos de pombos e outras aves, que, no entanto, não são infectados, são vetores dessa espécie para o ser humano. A principal espécie do gênero *Candida*, causadora da candidíase é a *C. albicans*, porém outras espécies não *albicans* como: *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, estejam se tornando cada vez mais importantes como agentes etiológicos²⁷. Essas tendem a se proliferar mais no verão, podendo ser contraídas em contato com areia de praia. São leveduras que podem causar infecções

cutâneas, das mucosas, principalmente em mulheres, nas unhas e mais raramente, infecções disseminadas e profundas em indivíduos debilitados ou imunodeprimidos. Fazem parte desse grupo as espécies que têm mostrado patogenicidade²⁸.

Os fungos filamentosos - podem ser encontrados em diferentes ecossistemas. São organismos heterotróficos que atuam como saprófitas, parasitas ou em simbiose²⁹. São ricas fontes de metabólitos, com mais de 3000 moléculas caracterizadas, sendo 1600 dessas com propriedades antibióticas ou antitumorais, e uma variedade de moléculas biodegradadoras de matéria orgânica, que atuam na manutenção das florestas e no equilíbrio dos ecossistemas. Contudo algumas espécies podem se constituir em patógenos oportunistas, caso esse equilíbrio natural seja rompido, e, dependendo do impacto ambiental, uma espécie pode prevalecer sobre outras, podendo adquirir resistências devido à força seletiva imposta ao meio, oferecendo risco à saúde das pessoas, animais e ambiente. Assim, o conhecimento da microbiota do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por esses organismos, tornando-os importantes para as interações ambientais, e em aplicações biotecnológicas³⁰. Dessas acepções, devemos ressaltar as propostas feitas por Sarquis¹⁶ e

Gomes³¹, considerando a importância dos ecossistemas e a escassez de estudos no Brasil que tratam da micota filamentosa em ambientes marinhos, e ainda a necessidade do conhecimento da diversidade desses microfungos nas praias, que realizaram coletas em que foram isoladas e identificadas amostras de areia da praia de Ipanema, Rio de Janeiro, Brasil; areia e água em duas praias de Olinda, Pernambuco, Brasil, sendo a maior frequência de fungos encontrada pertencente aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*³¹, corroborando com estudos de contaminação de areia de praias mais referenciados: (a) *Aspergillus* é um gênero de fungos filamentosos, encontrado no ambiente que pode causar Aspergiloses, na forma invasiva, oportunistas alérgicas e/ou toxigênicas, podendo infectar diversos órgãos em indivíduos imunossuprimidos; (b) Espécies de *Fusarium*, normalmente considerados contaminantes, agentes frequentes de infecções oculares, mais raramente infecções da pele e das unhas, e infecções sistêmicas. As espécies deste gênero são potencialmente toxinogênicas³².

Parasitas

Animais como cães e gatos possuem muitos parasitos próprios, cujas larvas infectantes só completam seu ciclo nesses hospedeiros³³. Contudo, eles atuam como

hospedeiros definitivos de algumas parasitoses intestinais que assume grande importância em saúde pública, pois os humanos podem acidentalmente se infectar resultando em inúmeros agravos a sua saúde, e o ambiente de recreação constituído por areia é um dos locais preferidos desses animais para depósito das fezes. Atualmente, um aumento crescente de animais domiciliados e peri domiciliados ganham acesso a áreas de lazer como praia e praças públicas aumentando consideravelmente o risco de infecção ao homem. Este fato é devido ao fato que as formas evolutivas infectantes têm seu desenvolvimento no ambiente, a partir das fezes desses animais. Várias pesquisas foram realizadas no Brasil e no mundo com o intuito de diagnosticar a contaminação do solo por helmintos com potencial zoonótico. Dentre os vários helmintos encontrados destacam-se o *Ancylostoma braziliense*, *Toxocara canis* e *Trichuris sp* por serem os mais frequentes, encontrados tanto diretamente nas fezes dos cães, como também em areias ou terras examinadas³⁴.

Os Geo-helmintos - são aqueles cujo ciclo evolutivo, em parte, ocorre predominantemente no solo (que por sua vez podem ser fonte de infecção, contendo larvas infectantes ou ovos) prescindindo de outro hospedeiro além de homem. A maioria das infecções causadas por geo-helmintos ocorre

na África subsaariana, nas Américas, China e leste da Ásia. Estimativas recentes da OMS (2009) sugerem que *Ascaris lumbricoides* infecta mais de um bilhão de pessoas, enquanto *Trichuris trichiura* 795 milhões e *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* infectam 740 milhões. Os helmintos transmitidos pelo solo produzem um grande número de sintomas que incluem: manifestações intestinais (diarréia, dor abdominal), fraqueza e mal estar geral, que podem afetar o trabalho, a capacidade de aprendizagem e o crescimento. Os Ancilostomídeos causam perda sanguínea intestinal crônica que resultam em anemia. Assim, as doenças transmitidas através do solo são consideradas como um dos mais sérios problemas de saúde pública em virtude dos efeitos que causam na população, alta prevalência e distribuição praticamente mundial³⁵.

De uma maneira geral, os ovos dos geohelmintos necessitam de um ambiente propício: boa oxigenação, alta umidade (>90%) e temperatura entre 20°C e 30°C. Essas condições são indispensáveis para que se processe a embriogênese, a formação da larva, e em alguns casos, a eclosão da larva no meio ambiente³⁶. Os ovos dos parasitos atingem o solo através de dejetos humanos ou animais infectados. Assim, após a maturação, podem atingir o hospedeiro por meio da ingestão dos ovos ou através da penetração

por via cutânea. Dentre as espécies que infectam o homem destacam-se os geohelmintos: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Strongyloides stercoralis*³⁷.

DOENÇAS CAUSADAS POR EXPOSIÇÃO À ÁGUA E AREIA

Existe crescente preocupação dos órgãos ambientais e da sociedade com a significativa contaminação das areias das praias, pelo descarte inadequado de lixo, dejetos de animais ou poluição trazida pelas marés, que podem carregar bactérias, fungos e parasitas patogênicos¹⁵. Com base em estudos epidemiológicos, Bonilla³⁸ e Alm³⁹ associam as doenças intestinais com a exposição à água e areia de recreação ou ambas. Sendo a gastroenterite a doença mais comum, que, associada à água poluída por esgotos, ocorre numa grande variedade de formas e pode apresentar um ou mais dos seguintes sintomas: enjôo, vômitos, dores de estômago, diarréia, cefaléia e febre, podendo ocorrer outras manifestações menos graves como infecções dos olhos, ouvidos, nariz e garganta. De acordo com o estudo realizado pela Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Básico (CETESB) de São Paulo, SP, Brasil, existe forte correlação entre a presença dos patógenos *Escherichia coli* e

Enterococos associada à gastroenterite em nadadores; os gêneros *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram também associados como responsáveis por doenças em banhistas, principalmente os que apresentam baixa imunidade⁴⁰.

Deve-se, contudo, salientar que o fato de a praia estar imprópria não significa que todas as pessoas, que se banharem no local, irão contrair alguma dessas doenças; isso depende das condições imunológicas de cada um e do tipo de exposição de cada um como, por exemplo, se permaneceu por muito tempo na água, se mergulhou a cabeça ou se engoliu água. A impropriedade significa que existe o risco de se contrair tais doenças. Dentre os 59 surtos de doenças ocorridos nos EUA entre 1999 e 2000, 61% são de gastroenterite associados à exposição a águas de recreação³⁹. Estudo realizado na Espanha em 2001 relaciona, por meio de entrevistas, a exposição à areia contaminada com risco à saúde e doenças gastrointestinais, e foi encontrada correlação dos sintomas com o aumento de coliforme total⁴¹. Segundo Lee⁴², existe, na literatura, um maior número de estudos epidemiológicos associados à água de praia no Brasil e no exterior do que os encontrados com a associação de patógenos presentes em areia, principalmente os que associam doenças intestinais à exposição de água e ou areia de recreação³⁸. Os técnicos do Setor de Águas Litorâneas da CETESB

apresentaram, durante o Seminário sobre balneabilidade em Santos, um estudo que comparou a incidência de doenças gastrointestinais com a balneabilidade das praias e concluíram que existe correlação direta entre doença e exposição à água de praias contaminadas, como também o maior risco em crianças. Os EUA, por meio da EPA em 1986, concluíram que, com níveis de 200 coliformes termotolerantes por 100 mL, há o risco de se contrair doenças gastrintestinais em 15 casos por 1.000 pessoas, que freqüentam águas marinhas e em 6 casos por 1.000 pessoas, que freqüentam águas doces. Após avaliação da água doce em praias da região dos Grandes Lagos, nos verões de 2003 e 2005, e águas salinas na mesma estação, em 2005 e 2007, por meio de pesquisas que continuaram em diferentes praias no verão de 2009, os EUA realizaram esta pesquisa com a finalidade da descoberta de meios mais rápidos e para conhecer os verdadeiros riscos de doenças resultantes da exposição a diferentes fontes de contaminação fecal em águas de recreação, com a finalidade da obtenção de novos critérios de qualidade de água recreacional. Em função disso, os EUA vêm conduzindo a investigação e avaliação de informações relevantes para fornecer a base científica para revisão de novos critérios para o controle de qualidade de águas em 2012²⁴.

CONCLUSÃO

Conclui-se dessas aceções que é necessário ter limites com múltiplos bioindicadores de risco de patogenicidade relacionado á exposição à areia e a água das áreas de recreação. A definição dos parâmetros relacionados ao risco de exposição constitui elemento de grande facilidade na área de gestão de risco. O monitoramento desses bioindicadores por parte dos órgãos de vigilância em saúde e ambiente, comparando com os parâmetros adequados pode levar redução da dificuldade de associar a ocorrência do patógenos com a obtenção de dados precisos sobre o aparecimento da doença na população, e, portanto maior controle da doença e da saúde do ambiente. A falta de relato adequado sobre o surgimento de determinada enfermidade provocada por patógeno relacionado à falta de saneamento, e da associação entre a qualidade sanitária do ambiente com o risco nele existente demonstra a necessidade de acompanhamento e fiscalização das matrizes ambientais dos ambientes utilizados como áreas de recreação, como a praia. O desconhecimento do risco associado à falta de qualidade sanitária dos ambientes devido à inexistência de monitoramento periódico nestes locais torna algumas áreas de recreação propícias à transmissão de patógenos presentes nas diferentes matrizes ambientais (água ou

areia), portanto constituem problemas de saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Philippi Junior A, Galvão Junior AC. Gestão do saneamento básico: abastecimento de água e esgotamento sanitário. Barueri, SP: Editora Manole Ltda, (Coleção ambiental); 2012.
2. Brasil. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Programa de Modernização do Setor Saneamento (PMSS). Cordeiro BS (coord). Prestação dos Serviços Públicos de Saneamento Básico. Lei Nacional de Saneamento Básico: perspectivas para as políticas e gestão dos serviços públicos. Volume 3. Brasília; 2009.
3. Oliveira EG, Rabello A. Planejamento Ambiental em bacias Hidrográficas: Um estudo preliminar de indicadores socioambientais na Microbacia do Quarenta (Manaus-AM). In: Anais do I Congresso Brasileiro de Organização do Espaço, Rio Claro/SP, UNESP; 2010. p. 4962-4981.
4. Moraes DSL, Jordão BQ. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a

- saúde humana. Revista Saúde Pública. 2002; 36 (3): 370-374.
5. Sandifer PA, Holland AF, Rowles TK, Scott GI. The oceans and human health. Environmental Health Perspectives. 2004; 112 (8): A454 – A455.
 6. Von Sperling M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos: princípios do tratamento biológico de águas residuárias. 3ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA - UFMG; 2005.
 7. Rego JCV. Qualidade sanitária de água e areia de praias da Baía de Guanabara [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca; Fundação Oswaldo Cruz; 2010.
 8. CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Qualidade das praias litorâneas do Estado de São Paulo. Governo do Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria de Meio Ambiente; 2009.
 9. Rouquayrol MZ, Almeida Filho N. Epidemiologia e saúde. 5ª ed. Rio de Janeiro: MDSI; 1999.
 10. Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº274, de 29 de novembro de 2000. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 25 jan. 2001; Seção 1, p. 70-71.
 11. Rio de Janeiro. (Município). Secretaria Municipal de Meio Ambiente. Resolução SMAC nº 81/2000, Rio de Janeiro. 28/12/2000. Dispõe sobre a análise e informações das condições das areias das praias no Município do Rio de Janeiro.
 12. Rio de Janeiro. (Município). Secretaria do Meio Ambiente. SMAC. Resolução SMAC Nº468 de 28/01/2010. Dispõe sobre a análise e informações das condições das areias das praias no Município do Rio de Janeiro.
 13. Amaral LS. Monitoramento de parasitos e coliformes como parâmetros de avaliação sanitária de areia e água de praias da Baía de Guanabara [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca; Fundação Oswaldo Cruz; 2012.
 14. União Européia. Directiva. Proposta de Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho da União Européia de 24 de outubro de 2002. Relativa à qualidade das águas balneares. 2002/ 0254 (COD): 1-42.

15. Boukai N. Qualidade sanitária da areia das praias no município do Rio de Janeiro: diagnóstico e estratégia para monitoramento e controle [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2005.
16. Sarquis MIM, Oliveira PC. Diversity of microfungi in the sandy soil of Ipanema Beach, Rio de Janeiro, Brazil. *J. Basic. Microbiol.* 1996; 36(1):51-58.
17. Pelczar M, Reid R, Chan E. *Microbiologia*. v. II. São Paulo: McGraw-Hill; 1981.
18. Prescott LM. *Microbiology*. In: Mascarenhas A, Martins J, Neves M. Avaliação de tratamento de águas superficiais efetuada na ETA de Alcantarilha com base na análise de indicadores de poluição fecal. Algarve: Univ. Algarve; 1996. Disponível em: http://www.ualg.pt/npfcma/docs/trab_eamb/micro_ETA.pdf.
19. American Public Health Association. APHA. Standard methods for examination of water and waste water. 21th ed. Washington: 2005.
20. Shibata T, Solo-Gabriele HM, Fleming LE, Elmir S. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. *Water Research* 2004; 38: 3119-3131.
21. Bonilla TD, Nowosielski K, Cuvelier M, Hartz A, Green M, Esiobu N, McCorquodale DS, Fleisher JM, Rogerson A. Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure. *Marine Pollution Bulletin* 2007; 54: 1472-1482.
22. Gronewold AD, Wolpert RL. Modeling the relationship between most probable number (MNP) and colony-forming unit (CFU) estimates of fecal coliform concentration. *Water Research*. 2008; 42: 3327-3334.
23. Mendes B, Nascimento MJ, Oliveira JS. Preliminary characterization and proposal of microbiological quality standard of sand beaches. *Water Sci. Technol.* 1993; 27(3-4):453-456.
24. Environmental Protection Agency. (United States). Bacteriological ambient water quality criteria for marine and fresh recreational waters. EPA: Washington, DC; 1986.

25. Manafi, M. New developments on chromogenic and fluorogenic culture media. *Int. J. Food Microbiol.* 2000; 60: 205-218.
26. Andraus S. Aspectos microbiológicos da qualidade sanitária das águas do mar e areias das praias de Matinhos, Caiobá e Guaratuba - PR [dissertação]. Paraná: Universidade Federal do Paraná; 2006.
27. Kern ME, Blevins KS. *Micologia médica: texto e atlas.* 2 ed. São Paulo: Premier; 1999.
28. Associação Bandeira Azul da Europa. Agência Portuguesa do Ambiente. Monitorização da qualidade das areias em zonas balneares: época balnear de 2008. Lisboa, 2008.
29. Silva ENB, Cavalcanti MAQ, Souza-Motta CM. Pathogenicity characteristics of filamentous fungi strains isolated from processed oat. *Revista de Microbiologia.* 1999; 30:377-380.
30. Gomes DNF. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Recife [tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2007.
31. Gomes DNF, Cavalcanti MAQ, Fernandes MJS, Lima DMM, Passavante JZO. Filamentous fungi isolated from sand and water of "Bairro Novo" and "Casa Caiada" beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. *Braz. J. Biol.* 2008; 68(3):577-582.
32. Maier LM, Oliveira VR, Rezende KCR, Vieira VDR, Carvalho CR. Avaliação da presença de fungos e bactérias patogênicas nas areias de duas praias de baixo hidrodinamismo e alta ocupação humana no litoral do município do Rio de Janeiro (estudos cariocas). Rio de Janeiro: Instituto Municipal de Urbanismo Pereira Passos; 2003.
33. Matesco VC, Mentz MB, Rott MB, Silveira CO. Contaminação sazonal por ovos de helmintos na praia de Ipanema, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Pat. Tropical.* 2006; 35: 135-141.
34. Silva PF, Cavalcanti IMD, Irmão, JI, Rocha FJ. Common beach sand contamination due to enteroparasites on the southern coast of Pernambuco state, Brazil. *Rev. Inst. de Medicina Tropical de São Paulo.* 2009; 51: 217-218.

- 35.** Mello, CBS. Avaliação parasitológica e contaminação sazonal de areias de parques públicos na região da zona leste da cidade de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Departamento de Saúde Ambiental, Universidade de São Paulo; 2010.
- 36.** Rey L. Parasitologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- 37.** Anaruma FF. Toxocaríase humana e parasitoses intestinais em áreas sob o risco de enchentes no município de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil [tese]. São Paulo: Universidade de Campinas; 2002.
- 38.** Bonilla TD, Nowosielk K, Auvelier M, Hartz A, Green M. Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure. *Marine Pollution Bulletin*. 2007; 54:1472-1482.
- 39.** Alm EW, Burke J, Spain A. Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. *Water Research*. 2003; 37:3978-3982.
- 40.** Sato MIZ, Di Bari M, Lamparelli CC, Truzzi AC, Coelho LS, Hachich EM. Qualidade sanitária de areia de praias recreacionais em São Paulo. *Braz. Jour. of Microbiology*. 2005;36:321-326.
- 41.** Prieto MD, Lopez B, Juanes JA, Revilla JA, Llorca J, Delgado-Rodríguez M. Recreation in coastal waters: health risks associated with bathing in sea water. *J. Epidemiol. Community Health*. 2001; 55: 442-447.
- 42.** Lee SH, Levy DA, Craub GF, Beach MJ, Calderon RL. Surveillance for waterborne disease outbreaks: United States, 1999-2000. *Morb. Mortal Wkly Rep*. 2002; 51:1-45.

Sources of funding: No

Conflict of interest: No

Date of first submission: 2013-03-07

Last received: 2013-03-07

Accepted: 2013-08-29

Publishing: 2014-09-30