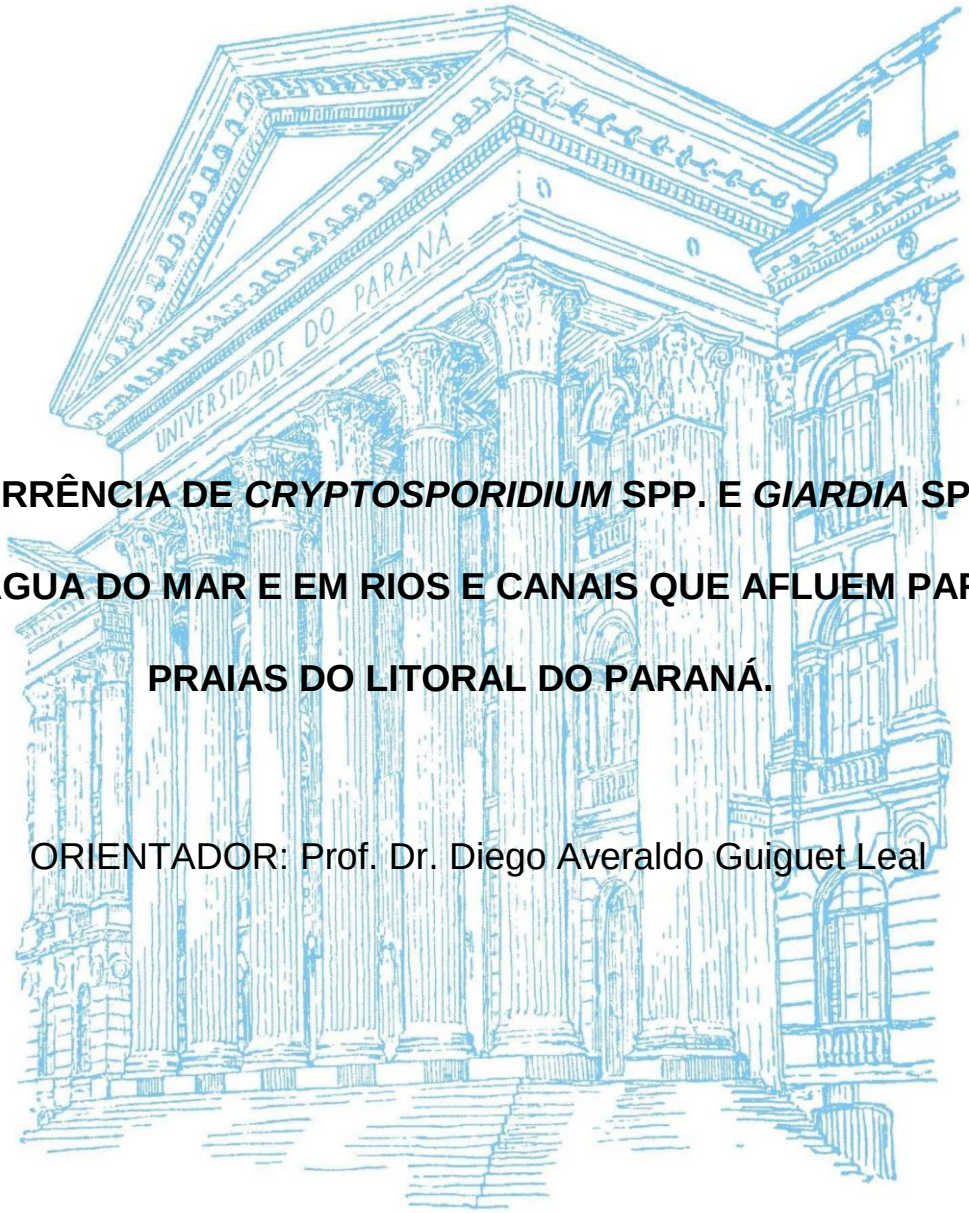
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA RODRIGUES



OCORRÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. E *GIARDIA* SPP. EM ÁGUA DO MAR E EM RIOS E CANAIS QUE AFLUEM PARA PRAIAS DO LITORAL DO PARANÁ.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal

Curitiba

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA RODRIGUES

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Paraná, sob orientação do Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal.

CURITIBA

2016

SUMÁRIO

RESUMO 1

LISTA DE TABELAS 3

LISTA DE FIGURAS 4

1. INTRODUÇÃO 5

2. JUSTIFICATIVA 9

3. OBJETIVOS 10

3.1 OBJETIVO GERAL: 10

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 10

4. REVISÃO DA LITERATURA 11

4.1 *Cryptosporidium* e *Giardia*: considerações gerais. 11

4.2 Gênero *Cryptosporidium* 20

4.3 Gênero *Giardia* 31

4.4 O litoral paranaense 38

5. MATERIAL E MÉTODOS 39

5.1 Levantamento de dados e de bibliografia em periódicos 39

5.3 Coleta das amostras de água 41

5.4 Processamento das amostras hídricas para a pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia* 41

5.4.1 Visualização dos parasitos por reação de imunofluorescência direta (RID). 43

5.4.2 Cálculo do número de oocistos e/ou cistos encontrados por litro na água do rio e na água marinha em situação natural de contaminação 46

6. RESULTADOS 47

6.1 Ocorrência natural dos protozoários na água de rio e mar nas praias de Matinhos e Caiobá. 47

6.2 Concentração de oocistos por litro de amostra. 48

7. DISCUSSÃO 50
8. CONCLUSÃO 59
9. REFERÊNCIAS 60
10. ANEXOS 72

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas diversas bênçãos e conquistas que me fizeram persistir no meu caminho e perseguir meus sonhos.

Aos meus pais Cristina e Naro que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em minhas escolhas, sempre me guiando, orientando meus passos e dando carinho. Agradeço pelo amor, dedicação e esforço que tiveram pra que eu tenha uma boa educação, sei que sempre priorizaram isso na minha vida.

Aos amigos que conquistei durante esta jornada de estudos e colegas de laboratório Aline, Anankha, Daniel, Fabiolla, Feliphe, Luiza, Maíra, Paloma, Rafael e Vinicius. Muito obrigada pelas mensagens de apoio e carinho. Agradeço também pelas palavras de conforto nas horas difíceis, momentos de distração e pela ajuda de trabalho.

Agradeço também a Patrícia Ribeiro que além de colega de laboratório foi uma grande amiga durante essa caminhada ajudando e dando apoio em momentos de dúvida, sempre disposta a me ajudar quando precisei.

A todos os professores que durante a graduação contribuíram para a minha formação profissional, partilhando seu tempo e conhecimento. Em especial ao meu orientador Professor Dr Diego Averaldo Guiguet Leal que se dedicou a me ensinar enfrentando os problemas da melhor maneira possível, obrigada pela paciência e atenção.

E a Biologia por ser uma área de conhecimento tão ampla e me proporcionou experiências que levarei para o resto da vida.

RESUMO

Os surtos epidêmicos de gastroenterite que acometem turistas e a população autóctone de áreas costeiras, relacionados com a recreação, além de constituírem um risco à saúde humana, provocam receio na população e conseguinte reflexo negativo para o país, com prejuízos econômicos para o turismo e para a saúde pública. Anualmente, observa-se a recorrência da incidência, especialmente no verão, de surtos de gastroenterite, conjuntivites e doenças de pele de etiologia não confirmada associados à recreação em ambientes marinhos. A atenção da mídia nacional e internacional tem sido focada também nesta questão, devido á realização dos principais eventos esportivos mundiais no Brasil e a ocorrência de surtos que evidenciam a má qualidade das praias. Em adição, não existe no Brasil uma legislação que indique a pesquisa de importantes patógenos que apresentam distribuição ubíqua e marcada resistência ambiental como os protozoários patogênicos em áreas destinadas à recreação humana. Em diversos países do mundo, incluindo o Brasil, a pesquisa de indicadores bacteriológicos de contaminação fecal é mais amplamente empregada para a verificação da qualidade da água, embora as bactérias sejam mais sensíveis a fatores abióticos como a radiação solar e salinidade e, removidas mais rapidamente do ambiente. A criptosporidiose e a giardiose apresentam maior expressividade quanto à sua transmissibilidade mediante a veiculação hídrica. Atividades recreacionais têm sido apontadas como fontes de infecções e aquisição de ambas as parasitoses. No Brasil, os estudos acerca da epidemiologia ambiental de protozoários patogênicos em águas recreacionais ainda são incipientes, e, inexistentes no litoral do Paraná. Desta forma, o presente projeto teve como objetivo principal realizar a caracterização da balneabilidade de diferentes praias do litoral do Paraná, quanto à contaminação por protozoários patogênicos (espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia*) em água do mar e em rios e canais que afluem para o mar. As amostras hídricas foram analisadas pela técnica de filtração em membranas. A visualização dos protozoários foi realizada através da reação de imunofluorescência direta, empregando-se anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* e a confirmação da morfologia dos protozoários feita com a utilização de microscopia de contraste de interferência diferencial. Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em 3 dos 4 pontos de água analisados. Elevadas concentrações de oocistos foram detectadas em água de rio e canais, variando de 86,6 a 173,2 / litro. Na água do mar, foram detectados em uma amostra – concentração de 124,5 / litro. Os resultados demonstram importante impacto de contaminação fecal dos ambientes utilizados para recreação humana nas praias do litoral do Paraná e, um risco potencial em saúde pública de aquisição de criptosporidiose, com implicações mais graves para populações que não apresentam higidez do sistema imunológico, devido à característica oportunista do protozoário. Além disso, demonstram a necessidade de realização do monitoramento de protozoários e adequação das legislações em nível estadual e nacional quanto à balneabilidade de estuários e praias destinados à recreação humana.

Palavras chaves: *Cryptosporidium*; *Giardia*; balneabilidade; água do mar; Paraná.

ABSTRACT

Epidemic outbreaks of gastroenteritis affecting tourists and autochthonous population of coastal areas, related to recreation, besides posing a risk to human health, cause fear in the population and consequently negative impact to the country, with economic loses for tourism and for Public health. Annually, there is a recurrence of the incidence, especially in summer, of outbreaks of gastroenteritis, conjunctivitis and skin diseases of unconfirmed etiology associated with recreation in marine environments. The attention of the national and international media has also been focused in this issue, due to the realization of major worldwide sporting events in Brazil and, focusing also in the impact an occurrence of national outbreaks, evidencing the poor quality of national beaches. In addition, there is no legislation in Brazil that indicates the survey of important pathogens which possesses ubiquitous distribution and marked environmental resistance as the pathogenic protozoa in areas destined to human recreation. In several countries around the world, including Brazil, the survey of bacteriological indicators of fecal contamination is the most widely used parameter to verify water quality, although bacteria are more sensitive to abiotical and critical factors such as solar radiation and salinity, and are removed more rapidly through the environment. Water is undoubtedly the most expressive transmission route of Cryptosporidiosis and a giardiosis. Recreational activities have been proved to be an important transmission and acquisition route of waterborne parasites. In Brazil, studies concerning the environmental epidemiology of pathogenic protozoa in recreational waters are still incipient and nonexistent on the Paraná coast. In this context, the main goal of this project was to characterize the balneability of different beaches along the coast of Paraná, in relation to contamination by pathogenic protozoa (*Cryptosporidium* and *Giardia* species) in sea water and in rivers and channels that flows to these areas. Water samples were analyzed by membrane filtration technique. Protozoa visualization were performed by direct immunofluorescence assay using anti-*Cryptosporidium* and anti-*Giardia* monoclonal antibodies and, the confirmation of the morphology of protozoa, was made using differential interference contrast microscopy. *Cryptosporidium* oocysts were detected in 3 of the 4 water points selected to analysis. High concentration of oocysts was detected in river water and canals, ranging from 86.6 to 173.2 / liter. In sea water, they were detected in a sample - concentration of 124.5 / liter. The results demonstrate an important impact of fecal contamination of the environments destined to human recreational activities on beaches of the coast of Paraná and, a potential public health risk of acquisition of cryptosporidiosis, with more serious implications for populations which presents immunological impairments due to the opportunistic nature of the parasite. In addition, denote a need to perform the monitoring of protozoa and suit legislation at the state and national level regarding the balneability of estuaries and beaches destined for human recreation.

Keywords: *Cryptosporidium*; *Giardia*; balneability; Seawater; Paraná.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Ocorrência e concentração de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em águas marinhas e estuarinas do mundo. 15

Tabela 2 Espécies de *Cryptosporidium* aceitas, confirmadas por análises moleculares e espectro de hospedeiros. 23

Tabela 3 Espécies e genótipos do gênero *Giardia*. 33

Tabela 4 Resultados da contaminação por protozoários parasitos em amostras ambientais coletas no litoral do Paraná. 47

Tabela 5 Número de oocistos brutos visualizados por reação de imunofluorescência direta. 48

Tabela 6 Concentração de oocistos por litro em diferentes praias do litoral do Paraná. 49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número total de surtos epidêmicos de transmissão hídrica e porcentagem de surtos ocasionados por *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e outros protozoários, no período de 1984 a 2010. 12

Figura 2: Oocistos de *Cryptosporidium*, ambos com presença de sutura, visualizados por reação de imunofluorescência direta, mediante emprego de anticorpos monoclonais.....26

Figura 3: Cisto de *Giardia* visualizado por microscopia de contraste de interferência (DIC). 34

Figura 4: Cisto de *Giardia*, visualizado por reação de imunofluorescência direta, mediante emprego de anticorpos monoclonais.....35

Figura 5: Localização dos pontos de coletas das amostras nas praias de matinhos e Caiobá, litoral do Paraná. 40

Figura 6: Procedimento de eluição das membranas: A - membranas após a filtração das amostras;.....42

Figura 7: A - Confecção da lâmina e B - lâmina pronta na câmara escura 45

Figura 8: Microscópio Zeiss Observer - Z1.....50

Figura 9: Presença de cão na água do mar de um dos pontos amostrados durante a pesquisa de protozoários patogênicos. 57

1. INTRODUÇÃO

A utilização de ambientes aquáticos pelo ser humano para o lazer e a natação é uma das atividades recreacionais mais populares em todo o mundo. A despeito dos benefícios desta atividade, o ato da natação pode expor os banhistas e nadadores a potenciais riscos químicos e biológicos na maioria das vezes ocultos à saúde pública (Moore et al., 2013).

Dispondo de um litoral de cerca de 8.000 km (Pereira e Soares-Gomes, 2002), as áreas costeiras brasileiras atraem todos os anos, muitos visitantes devido à sua beleza natural, clima tropical e águas mornas. De acordo com dados do Ministério do Turismo do Brasil (2014), o Estudo da Demanda Turística Internacional revelou que quase 47,0 % da população internacional que visitou o Brasil no período entre 2008 e 2014 vieram em busca de lazer. Entre estes turistas, 59,3 % viajaram motivados pelo sol e praias, seguidos por 21,4 % com predileção pela natureza, precisamente o ecoturismo e turismo de aventura.

Além do aspecto recreacional, muitas destas áreas servem como fonte de alimento ou de renda para as comunidades costeiras no Brasil (Leal et al., 2008; Souza et al., 2012; Leal et al., 2013a; Oliveira et al., 2016). No entanto, o despejo de águas residuais não tratadas ou tratadas em corpos hídricos é atualmente apontado como a principal fonte de contaminação e deterioração destes locais ou dos ambientes para os quais afluem, sendo responsável pela introdução de uma ampla variedade de enteropatógenos humanos que colocam em perigo a saúde dos banhistas (Lipp et al., 2001; Riou et al., 2007; Win-Jones et al., 2012; Koloren et al., 2013).

De acordo com o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2013) somente 48,6 % da população brasileira tem acesso à coleta de esgoto. Mais de 100 milhões de brasileiros não tem acesso a este serviço e, somente 39,0 % de todo o esgoto gerado no país é tratado. No estado do Paraná, as estimativas revelam que 60,0 % dos paranaenses possuem coleta de esgoto e 63,75 % tratamento de esgoto, porcentagem esta que posiciona o estado do Paraná com maior índice de tratamento de esgoto na região sul (SNIS, 2013). Entretanto, o saneamento do litoral paranaense é dissonante: na avaliação da infraestrutura e segurança sanitária realizada pela secretaria de estado do turismo (SETU) o saneamento das praias paranaenses mostrou-se deficiente.

Vírus e bactérias são os patógenos mais frequentemente incriminados como agentes etiológicos causadores de surtos epidêmicos de gastroenterite em seres humanos pela via hídrica, porém, nas últimas décadas, verificou-se que 524 surtos foram ocasionados por protozoários parasitos sendo *Giardia* e *Cryptosporidium* a causa de mais de 90,0 % destes em escala mundial (Karanis et al, 2007; Baldursson e Karanis, 2011).

A criptosporidiose e a giardiose são consideradas as principais protozooses transmitidas por veiculação hídrica em países desenvolvidos da América do Norte, Europa e Austrália, que contam com elevado padrão de abastecimento de água e tratamento de esgoto (Fletcher et al, 2012). Ressalta-se que cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* são resistentes a desinfetantes químicos como o cloro e seus derivados (Karanis et al., 2007).

As infecções ocasionadas por estes protozoários patogênicos intestinais podem representar uma ameaça à saúde humana; no caso da giardiose, ocorre uma expressiva falha do desenvolvimento físico e cognitivo em crianças e a infecção por *Cryptosporidium*

pode levar a um quadro de desidratação severa em categorias populacionais mais vulneráveis ou mais expostas, como os imunossuprimidos e imunodeficientes, pela ingestão de apenas um oocisto do protozoário, podendo ter término fatal (Rose et al., 2002).

Cryptosporidium e *Giardia* apresentam elevado potencial de dispersão ambiental, uma vez que uma grande quantidade de oocistos e cistos é eliminada nas fezes dos hospedeiros. Uma única evacuação de um indivíduo imunocompetente sintomático pode conter de 10^8 a 10^9 oocistos de *Cryptosporidium* assim como indivíduos imunodeficientes e animais jovens liberam cerca de 10^9 a 10^{10} oocistos durante o curso da infecção; os indivíduos parasitados podem ainda eliminar oocistos por até 60 dias após cessarem os principais sinais clínicos, especialmente a diarreia (Chappell et al, 1996; Cacciò et al., 2005).

A eliminação de cistos de *Giardia* pode chegar a 10^7 por grama de fezes, ampliando a contaminação das áreas costeiras e de diversos frutos do mar utilizados como alimentos, devido à sua eficiente capacidade de filtração e bioacumulação de contaminantes ambientais (Robertson et al, 2007; Smith et al 2007; Souza et al., 2013; Leal et al., 2008, 2013).

Ambos parasitos são também introduzidos em áreas costeiras e estuarinas mediante descarte ou carreamento de fezes de animais domésticos e de produção pela drenagem hídrica de sedimentos, ou pela presença de animais silvestres infectados, constituindo um potencial de contaminação ambiental por espécies zoonóticas capazes de infectar o ser humano (Fayer et al, 2004; Fayer e Lindsay, 2004; Graczyk et al, 2007).

Em diversos países do mundo, incluindo o Brasil, a pesquisa de indicadores microbiológicos de contaminação fecal é mais amplamente empregada para a verificação da qualidade de águas recreacionais, embora as bactérias sejam mais sensíveis a fatores abióticos como a radiação solar e salinidade e, removidas mais rapidamente do ambiente (Brasil, 2000; United States Environmental Protection Agency, USEPA, 2003; Ortega et al., 2009).

Patógenos entéricos, especialmente os protozoários patogênicos, são relevantes devido à elevada resistência aos estressores ambientais, sendo capazes de manter sua capacidade infectante inalterada por longos períodos em águas salinas ou salobras, resistindo a condições ambientais desfavoráveis ou letais para outros microrganismos, tais como extremos de pH, temperaturas elevadas, radiação ultra-violeta (UV) e especialmente a salinidade – oocistos mantem-se infecciosos por até um ano em água do mar (Johnson et al, 1997; Fayer et al., 1998; Tamburrini e Pozio, 1999).

Assim, os estudos que visem investigar patógenos não contemplados pela legislação brasileira associados à recreação humana em praias e estuários, são de extrema importância e relevantes para evitar doenças, prejuízo econômico e para o desenvolvimento de programas eficazes de gerenciamento de risco.

2. JUSTIFICATIVA

Anualmente observa-se a recorrência da incidência, especialmente no verão, de surtos de gastroenterite, conjuntivites e doenças de pele de etiologia não confirmada associados à recreação em ambientes marinhos.

A importância do estudo de parasitos intestinais - entre eles *Giardia duodenalis* e espécies de *Cryptosporidium* - em diferentes ambientes aquáticos, como agentes etiológicos de doenças é ressaltada pelo aumento do número de casos descritos, do número de surtos de veiculação hídrica ocasionados por estes protozoários e por sua distribuição ubíqua em áreas costeiras e estuarinas, inclusive em moluscos bivalves destinados à alimentação humana e cultivados nestes locais em escala mundial (Fayer et al., 2004; Robertson et al, 2007; Souza et al., 2012; Willis et al., 2013; Oliveira et al., 2016).

Ressalte-se a inexistência de legislações que preconizam a pesquisa de microrganismos patogênicos para a saúde humana no Brasil em águas costeiras (estuários, praias e balneários) destinadas à recreação humana, salvo quando estas regiões forem consideradas sistematicamente como impróprias (BRASIL, 2000).

Tendo em vista o exposto, o presente projeto apresentou como meta, a realização do monitoramento da balneabilidade das praias e qualidade sanitária da água do mar e de rios e canais que afluem para as mesmas, no litoral do Paraná, no que diz respeito à contaminação fecal por protozoários parasitos. A pesquisa teve como enfoque principal gerar e difundir dados inexistentes no litoral do Paraná quanto à contaminação por protozoários patogênicos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

- Realizar o monitoramento ambiental de protozoários patogênicos nas principais praias do litoral paranaense destinadas à recreação humana, como instrumento de aferição de sua qualidade sanitária e balneabilidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar e quantificar a ocorrência e concentração de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* na água do mar de duas praias do litoral paranaense

- Verificar e quantificar a ocorrência e concentração de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em rios e canais que afluem para diferentes praias do litoral paranaense.

- Realizar ampla revisão da literatura em diferentes bases de dados nacionais e internacionais para elaboração e submissão de projetos de pesquisa em diferentes agências nacionais de fomento.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Cryptosporidium e Giardia: considerações gerais.

A criptosporidiose e a giardiose apresentam distribuição cosmopolita figurando, na atualidade, como as principais enteroparasitoses causadoras de gastroenterite em seres humanos, animais domésticos e silvestres (Thompson, 2004; Cacció et al, 2005; Zahedi et al, 2016).

Ambos os protozoários parasitos apresentam similaridades quanto à sua transmissibilidade, distribuição e epidemiologia ambiental. *Cryptosporidium* e *Giardia* são transmitidos primariamente pela rota fecal-oral, mediante ingestão de oocistos e cistos respectivamente, sendo estas, as formas de resistência ambiental e infectantes eliminadas pelas fezes dos hospedeiros parasitados (Fayer et al, 1997; Cacció et al 2005).

Nas últimas três décadas, numerosos surtos de veiculação hídrica e alimentar tendo como agentes etiológicos ambos os protozoários parasitos, foram documentados em todo o mundo, especialmente em países desenvolvidos da América do Norte, Europa e Oceania, sendo estas vias de transmissão apontadas majoritariamente associadas à aquisição de ambas as parasitoses (Karanis, 2007; FAO, 2014; WHO, 2014).

De acordo com Karanis et al, 2007 e Baldursson e Karanis (2011) *Giardia* e *Cryptosporidium* foram responsáveis por ocasionar 524 surtos de veiculação hídrica em todo o mundo nas últimas três décadas (Figura 1).

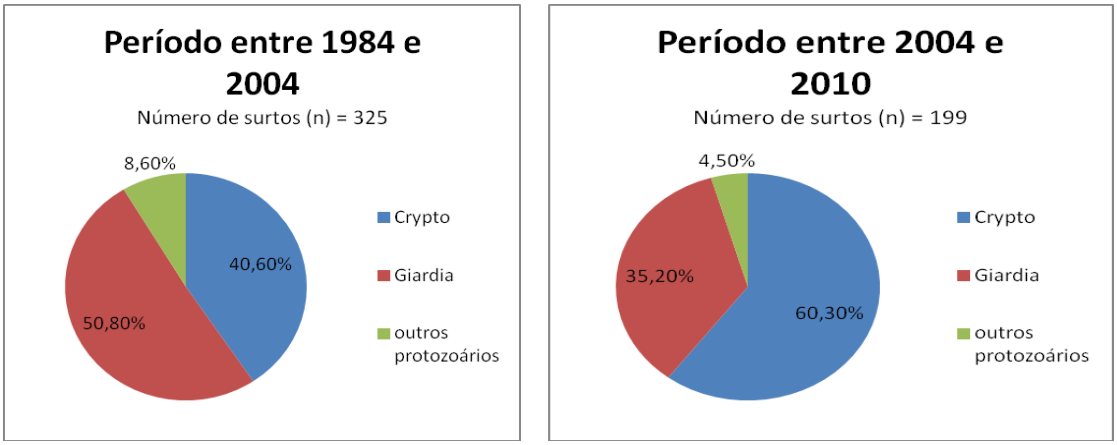


Figura 1: Número total de surtos epidêmicos de transmissão hídrica e porcentagem de surtos ocasionados por *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e outros protozoários, no período de 1984 a 2010. Fonte: Franco, Branco e Leal, 2012

Em outra revisão recente, um comitê de especialistas da Organização Mundial da Saúde (OMS) em parceria com especialistas da Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (FAO), realizaram o ranqueamento das principais parasitoses transmitidas por alimentos, tendo como critérios o número de surtos ocasionados, número de casos de Doenças transmitidas por alimentos (DTAs), severidade (morbidade expressiva), impacto sócio econômico, entre outros (OMS, 2014; FAO, 2014).

O protozoário *Cryptosporidium* destacou-se com a 5ª posição e *Giardia duodenalis* com a 11ª colocação no ranking entre todas as DTAs e entre as principais zoonoses globais veiculadas por alimentos, associados principalmente ao consumo de hortaliças, sucos, leite e moluscos bivalves (OMS, 2014; FAO, 2014).

O sucesso da transmissão hídrica e alimentar de ambas as parasitoses se deve a vários fatores, entre eles: a marcada resistência ambiental dos cistos e oocistos aos estressores ambientais, a estabilidade das formas parasitárias encistas no ambiente, conferindo manutenção da infectividade dos protozoários por semanas a meses; a baixa

dose infectante necessária para ocasionar infecções em hospedeiros susceptíveis (média de 10 (oo) cistos), a resistência à maioria dos desinfetantes à base de cloro e seus derivados, utilizados para potabilizar a água e, o elevado número de cistos e oocistos que já são eliminados infectantes pelas fezes dos hospedeiros parasitados sintomáticos ou assintomáticos (Smith et al, 2006; Thompson e Smith , 2011).

Entretanto, deve-se considerar que a recuperação de patógenos a partir de amostras ambientais, (água bruta, efluentes e alimentos), especialmente em situações de surtos, representa um desafio, pois estes podem estar presentes em pequenas concentrações ou não serem detectados devido à ocorrência de interferentes que influenciam negativamente a eficiência dos métodos utilizados para concentrar, purificar e recuperar patógenos ou contaminantes ambientais (Smith e Nichols, 2010; Girones et al, 2010, Leal, 2013).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas tecnologias de detecção que apresentam alta especificidade e sensibilidade (métodos imunológicos - como a reação de imunofluorescência direta e ferramentas moleculares), culminou com a implementação de métodos de detecção de enteropatógenos humanos em amostras ambientais complexas, garantindo maior acurácia ao diagnóstico e a possibilidade de determinação da real importância epidemiológica destes agentes (JEX et al, 2008; Girones et al, 2010; Leal, 2013).

Em amostras ambientais que apresentam menor turbidez, como as águas destinadas ao consumo humano, tem sido frequente o isolamento de ambos os protozoários, inclusive ocasionando numerosos surtos por estas vias em diversos países do mundo sendo considerado um importante problema de saúde pública. Porém, o conhecimento sobre esses riscos no Brasil, ainda são escassos (Franco et al, 2001; 2007).

Não existem relatos até o presente momento de surtos de veiculação hídrica documentados e atribuídos aos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* no Brasil e os dados de ocorrência e de sua epidemiologia ambiental e molecular, são decorrentes em sua maioria de pesquisas científicas (Franco, 2007).

Entretanto, já ocorreram surtos ocasionados pelos protozoários *Toxoplasma gondii* e *Cyclospora cayetanensis* por esta via no país, sendo ambos os parasitos incriminados como agentes causadores de surtos, entre estes, um dos maiores em escala mundial, no estado do Paraná. (Franco, 2007; Vaudaux et al, 2010).

Ressalte-se, portanto, a importância de selecionar alternativas mais eficientes de detecção e recuperação desses cistos e oocistos, nas águas destinadas ao consumo humano. Logo, os resultados dessas avaliações devem nortear as tomadas de decisões no que se refere aos sistemas de captação, tratamento e distribuição de água, pelos administradores públicos, visando à preservação dos corpos hídricos e à melhoria da qualidade de vida das populações humanas (Franco, Branco e Leal, 2012).

Atualmente têm crescido o número de surtos ocasionados por estas protozooses intestinais associados à recreação humana, especialmente em piscinas (Baldursson e Karanis, 2011).

Além disso, ambos os protozoários já foram identificados em água do mar de diferentes países, com concentrações variáveis sendo inclusive, realizada em alguns destes, a rastreabilidade das fontes de contaminação fecal mediante utilização de ferramentas moleculares (Tabela 1).

Tabela 1: Ocorrência e concentração de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em águas marinhas e estuarinas do mundo.

Localização	Amostragem / Resultados	Concentração de (oo)cistos	Fonte(s) de contaminação suspeita(s)	Referência
Praias de Waikiki, Havaí **(Estados Unidos).**	29 amostras; *Cryptosporidium*: 14,0% (4 amostras positivas); *Giardia*: 21,0 % (6 amostras)	*Cryptosporidium*: 0,01-0,11/L *Giardia:* 0,005-0,22/ L	Transbordamento de esgoto; escoamento superficial; banhistas; despejo de fezes por barcos.	Johnson et al, 1995.
Estuário Georges River Sydney **(Austrália).**	6 pontos amostrados / 10 ocasiões; *Cryptosporidium* e *Giardia* detectados em todos os pontos.	*Cryptosporidium* e *Giardia*: 1 (oo) cisto/L	Transbordamento de esgoto; escoamento superficial (associado com altos períodos de precipitação).	Ferguson et al, 1996.
Praias de **Hong Kong (China).**	64 amostras; vários pontos de amostragem; *Giardia*: 31 pontos de amostragem (48,0% de positividade).	*Giardia*: 1-23 cistos/L	Esgoto	Ho e Tam, 1998a.
Baia de Sarasota, Flórida **(EUA).**	11 pontos analisados *Cryptosporidium*: positividade em 3 pontos; *Giardia*: 1 ponto com amostra positiva.	*Cryptosporidium*: 10-16 oocistos/L *Giardia*: 16 cistos/L	Esgoto; rompimento de cano de esgoto; banhistas; despejo de fezes por barcos.	Lipp et al, 2001a.

Continua

Adaptado e atualizado de Leal, 2013.

Continua

Estuário Charlotte Harbor, Flórida **(Estados Unidos).**	8 pontos amostrados *Cryptosporidium*: 2 pontos com 1 amostra positiva; *Giardia*: 1 ponto com 1 amostra positiva e outro com 2.	Para ambos os protozoários: 0,047-1,77 (oo) cistos/ L	Escoamento superficial	Lipp et al, 2001
Mersin, região mediterrânea do sul da (**Turquia).**	*Cryptosporidium*: 1 amostra positiva;	Não reportado	Não reportado	Ceber et al, 2005.
Estuários da costa da Galícia **(Espanha).**	4 regiões estuarinas; 7 pontos amostrados em uma ocasião; *Cryptosporidium*: detectado em 5 pontos; *Giardia* 6 pontos	*Cryptosporidium*: 1-17 oocistos/L *Giardia*: 0,4-29,3 cistos/L	Efluente de esgoto; escoamento superficial	Gómez-Couso et al, 2005, 2006.
Estuário de Oosterschelde **(Holanda).**	2 pontos amostrados (2 vezes); *Cryptosporidium* e *Giardia*: detectados em 1 ponto em 2 períodos	*Cryptosporidium*: 1-4,9 oocistos/L *Giardia*: 0,6 cistos/L	Efluente de esgoto; escoamento superficial	Schets et al, 2007
Estuário – confluência com o Rio Sena **(França).**	8 amostras; 4 positivas para *Giardia* e 6 positivas para *Cryptosporidium*.	*Cryptosporidium*: 3-24 oocistos/L *Giardia*: 2,4-27 cistos/L	Despejo de efluentes brutos e tratados	Touron et al, 2007
Área costeira (**Tailândia)** após Tsunami.	12 amostras em 2005: *Cryptosporidium* e *Giardia* 2 amostras positivas para cada.	Não estabelecido (dados considerados como média geométrica de águas de torneira, rio,	Alagamento, contaminação por fezes de seres humanos e	Srisuphanunt et al, 2010.

Continua

	12 amostras em 2008: *Cryptosporidium* e *Giardia*: 1 amostra positiva para cada.	estuário, mar e poço).	animais devido à ocorrência de um Tsunami na região em 2004.	
Praia de Chesapeake Bay, Maryland **(Estados Unidos).**	Amostras coletadas durante onze semanas do verão americano: *Dias da semana* (n = 33 amostras) *Cryptosporidium parvum*: 2 amostras positivas *Giardia duodenalis*: amostras positivas (2) *Finais de semana* (n = 27 amostras) *Cryptosporidium*: 13 positivas; *Giardia*: 10 positivas	*Dias da semana* *C. parvum*: 0-7 oocistos/L *G. duodenalis*: 0-4 cistos/L *Finais de semana* *C. parvum*: 2-42 oocistos/L *G. duodenalis*: 0-33 cistos/L	Contingente de banhistas maiores nos finais de semana; Ressuspensão do sedimento da praia; Contaminação fecal	Graczyk et al, 2007c.
Duas praias destinadas à recreação humana em Sinaloa **(México).**	Praia de Altata; *Cryptosporidium*: 71,0 % das amostras positivas; *Giardia*: 57,0 %. Praia de Mazatlan: *Cryptosporidium*: 83,0% de positividade; *Giardia*: 72,0%.	Concentração total para ambas as praias: *Cryptosporidium*: 150-2050/10L *Giardia*: 10-300 / 10L	Efluentes brutos	Magana-Ordorica et al, 2010.

Quatro regiões marinhas da ilha de Florianópolis **(Brasil).**	Uma amostragem cada – regiões de cultivo de ostras. *Giardia duodenalis*: 1 ponto	Concentração não estimada. *Giardia duodenalis* pertencente ao **genótipo A**	Contaminação por efluente doméstico	Souza et al, 2012
Estuário de Cananéia, Litoral Sul de São Paulo **(Brasil).**	48 amostras coletadas de 4 pontos diferentes do estuário. *Giardia duodenalis*: Detectada em todos os 4 pontos com as seguintes positividades : 36.3%, 18.1%, 36.3% e 27.2% *Cryptosporidium*: detectado em um ponto de amostragem 9,0 %	Concentração não estimada. Isolamento por PCR e RID. *Giardia duodenalis* (Assembleias/ subgenótipos AII e C)	Contaminação por efluente doméstico e por fezes de animais domésticos.	Leal et al, 2013
Praias da costa central do país **(Venezuela).**	Mil amostras de água litorânea *Cryptosporidium*: 14% por imunofluorescência *Giardia*: 35% pelo mesmo método	Concentração estimada nas praias com maior índice de patógenos encontrados: *Cryptosporidium*: (2 oocistos / L) *Giardia*: (17 cistos / L)	Esgoto sendo considerado o maior carreador desses protozoários	Betancourt et. al, 2014

Continua

Praia de Orchard, principal fornecedora de moluscos a grande Nova York **(Estados Unidos).**	159 amostras de bivalves de diferentes espécies *Cryptosporidium*: 6,3% pelo método de PCR *Giardia*: 20,1% pelo mesmo método	Valor não estimado	Seres humanos e cães podem ter desempenhado um papel na contaminação da praia. Um fato interessante é que no mês de Agosto a praia foi fechada por contaminação fecal humana	Mayer et al. 2014

Em contraposição, no Brasil, dados sobre a ocorrência de protozoários parasitos em ambientes destinados à recreação humana como praias, estuários e balneários - entre estes alguns de caráter oportunista como *Toxoplasma gondii* e espécies de *Cryptosporidium* – são ainda mais escassos (Greinert et al, 2004; Leal et al, 2008; Souza et al, 2012; Leal et al, 2013).

4.2 Gênero Cryptosporidium

As primeiras aparições desse protozoário foram relatadas no início do século XX, em 1907 por Ernest Edward Tyzzer que documentou o encontro de oocistos do protozoário parasito nas fezes de camundongos e também, em suas glândulas gástricas.

Em 1910, Tyzzer descreveu o patógeno como *Cryptosporidium muris,* estabelecendo posteriormente seu ciclo de vida do tipo monoxênico (com alternância de reprodução sexuada e assexuada) em um mesmo hospedeiro, entretanto sem obter seu caráter taxonômico completamente.

Dois anos depois, foi descrita uma nova espécie, *Cryptosporidium parvum* publicado por esse mesmo pesquisador (Tyzzer, 1912); destacou-se a diferença no tamanho nos oocistos e o sítio de parasitismo, desta vez no intestino delgado.

A taxonomia do protozoário *Cryptosporidium* está em constante mudança. Primariamente, foi considerado por décadas como pertencente ao Filo Apicomplexa; Classe Sporozoasida; Subclasse Coccidiasina; Ordem Eucoccidiorida; Subordem Eimeriorina; Família Cryptosporidiidae (Levine et al, 1988; Fayer et al, 1997).

A taxonomia do gênero foi alterada anos depois, baseado em estudos moleculares e ultraestrutura de protistas classificando-o no supergrupo Chromalveolata, primeiro rank Alveolata, segundo rank Apicomplexa: Conoidasida: Coccidiasina (ADL et al, 2005).

Com as novas descobertas acerca do protozoário, especialmente sua capacidade de se reproduzir fora da célula do hospedeiro e exibir comportamento similar às gregarinas, houve nova reclassificação do protozoário parasito, agora pertencendo ao filo Miozoa, subfilo Myzozoa, Intrafilo Apicomplexa, superclasse Sporozoa, classe Gregarinomorphea, subclasse Cryptogregaria n.sc., ordem Cryptogregarida, gênero *Cryptosporidium*

(Ruggiero et al., 2015).

Após sua descoberta, anos se passaram sem que houvesse procura acerca desse protozoário em seres humanos, sendo considerado de baixa importância médica (Fayer et al., 1997). O surgimento dos primeiros casos em seres humanos foram reportados em 1976 sendo um deles em uma criança com quadro de diarréia aguda auto-limitada e imunossuprimida e o outro caso em um adulto que estava sob longo tratamento medicamentoso à base de corticosteroides, apresentando um quadro clínico de diarréia aguda de curso prolongado (Nime et al, 1976; Meisel et al, 1976).

A notoriedade do parasito, como causa primária de diarréia, caráter oportunista e risco de óbito, começou a ocorrer em 1982, com o advento do HIV/AIDS, acometendo severamente 21 pessoas portadoras do vírus em seis cidades dos Estados Unidos. (Goldfarb, 1982).

No começo da década de 90, foi reportado o maior surto de veiculação hídrica documentado por este parasito, na cidade estadunidense de Milwaukee, Estado de Wisconsin através do sistema de abastecimento de água da cidade (Mackenzie et al, 1994). Cerca de 403.000 pessoas foram atingidas pelo patógeno, sendo que 4000 foram hospitalizadas, 100 foram a óbito e destas 69 eram portadoras do vírus HIV.

A causa primária do surto foi a passagem de oocistos pelo sistema de tratamento de água da cidade, conhecida como ETA (Estação de Tratamento de Água), tendo um custo total estimado de mais de 90 milhões de dólares (Mackenzie et al, 1994).

Em consequência desse grande surto, vários estudos foram documentados sobre a doença, abrangendo várias características inerentes ao protozoário como particularidades biológicas, principais fontes de infecção, determinações genotípicas, aspectos clínicos da

doença, entre outros. Todos estes fatos somados provocaram uma maior atenção das entidades públicas quanto a esse protozoário, especialmente como uma preocupação aos sistemas tratadores de água e, ampla relevância na área ambiental e de pesquisa científica (Rose, 1997; Smith e Rose, 1998; Wiedenmann et al, 1998; Fayer et al, 2000; 2004; Dawson, 2005; Smith et al, 2007; Robertson e Gjerde, 2007 Ryan et al, 2016).

Atualmente, 29 espécies do protozoário do gênero *Cryptosporidium* e 40 genótipos são aceitos como válidos (Tabela 2), reportados em seres humanos e em ampla gama de hospedeiros animais. Contudo, ainda existem controvérsias quanto ao número de espécies e genótipos, sendo este tipo de estudo e classificação embasado mediante utilização de ferramentas moleculares e sequenciamento gênico (Zahedi et al, 2016; Thompson e Ash, 2016).

Cabe ressaltar, que das 29 espécies descritas atualmente, 17 são capazes de infectar os seres humanos (Zahedi et al, 2016) (Tabela 2).

Tabela 2 Espécies de *Cryptosporidium* aceitas, confirmadas por análises moleculares e espectro de hospedeiros.

Espécie	Hospedeiro principal	Infeccioso para o ser humano	Tamanho dos oocistos (µm)	Referência
1. *C. hominis*	**Homem**	**Sim**	**4.8 x 5,2**	**Morgan-Ryan et al. (2002)**
2. *C. parvum*	**Ruminantes**	**Sim**	**4,5 x 5,5**	**Tyzzer (1912)**
3. *C. andersoni*	**Bovinos**	**Sim**	**7,4 x 5,5**	**Lindsay et al. (2000)**
4. *C. muris*	**Roedores**	**Sim**	**5,6 x 7,4**	**Tyzzer (1907)**
5. *C. suis*	**Suínos**	**Sim**	**4,2 x 4,6**	**Ryan et al. (2004)**
6. *C. felis*	**Felinos**	**Sim**	**4,5 x 5,0**	**Iseki (1979)**
7*. C. canis*	**Canídeos**	**Sim**	**3.6 x 5,8**	**Fayer et al. (2001)**
8. ***C. bovis***	**Bovinos**	**Nenhum relato**	**4,6 x 4,8**	**Fayer et al. (2005)**
9. *C. ryanae*	Bovinos	Nenhum relato	3,1 x 3,7	Fayer et al. (2008)
10. ***C. xiaoi***	**Ovelhas**	**Nenhum relato**	**2,9 x 3,4**	**Fayer et al. (2010)**
11. *C. wrairi*	Roedores	Nenhum relato	4,0 x 4,8	Vetterling et al. (1971)
12. *C. baileyi*	Aves	Nenhum relato	6,3 x 5,2	Current et al. (1986)
13. *C. meleagridis*	**Aves**	**Sim**	**4,5 x 4,6**	**Slavin (1955)**
14. *C. galli*	Aves	Nenhum relato	6,4 x 8,5	Ryan et al. (2003)

15. *C. serpentis*	Répteis	Nenhum relato	4,8 x 5,6	Levine (1980)
16. *C. fayeri*	**Cangurus**	**Sim**	**4,3 x 4,9**	**Ryan et al. (2008)**
17. *C. macropodum*	Cangurus	Nenhum relato	4,9 x 5,4	Power e Ryan (2008)
18. *C. varanii*	Lagartos	Nenhum relato	4,7 x 4,8	Pavlasek e Ryan (2008)
19. *C. ubiquitum*	**Cervos**	**Sim**	**5,0 x 4,7**	**Fayer et al. (2010)**
20. *C. cuniculus*	**Coelhos**	**Sim**	**5,9 x 5,4**	**Robinson et al. (2010)**
21. *C. rubeyi*	Esquilos	Nenhum relato	4,6 x 4,3	Li et al. (2015)
22. *C. scophthalmi*	Peixes	Nenhum relato	4.4 × 3.9	Alvarez-Pellitero et al. (2004)
23. *C. huwi*	Peixes	Nenhum relato	4.6 x 4.4	Ryan et al. (2015)
24. *C. erinacei*	**Ouriço terrestre**	**Sim**	**4,9 x4,4**	**Kvác et al. (2014)**
25. *C. scrofarum*	**Porcos**	**Sim**	**5.1 x 4.8**	**Kvác et al. (2013)**
26. *C. viatorum*	**Homem**	**Sim**	**5.3 x 4.7**	**Elwin et al. (2012)**
27. *C. tyzzeri*	**Camundongos**	**Sim**	**4.6 x 4.1**	**Ren et al. (2012)**
28. *C. molnari*	Peixes	Nenhum relato	4.7 x 4.4	Alvarez-Pellitero e Sitja-Bobadilla (2002)
29 *C. fragile*	Sapos	Nenhum relato	6.2 × 5.5	Jirků et al. (2008)

Adaptado de Leal (2013) e atualizado de Zahedi et al 2016. ***Espécies reportadas em seres humanos.**

Independente da espécie, os oocistos de *Cryptosporidium* são as formas infectantes e exibem ampla resistência ambiental. Consequentemente, dentre os coccídios o que se destaca nesse protozoário é a parede do oocisto composta por lipídeos, fibrilas de actina, carboidratos e ligações de dissulfeto, confirmando sua natureza robusta (Robertson et al., 2007).

O oocisto manifesta uma sutura (Figura 1) por onde são eliminados 4 esporozoítos móveis, fenômeno este conhecido como excistação, que ocorre após a ingestão de oocistos infectantes por um hospedeiro susceptível (Sodré e Franco, 2001). Estes são desprovidos de esporocistos e eliminados já infectantes no ambiente o que não ocorre com os demais coccídios do Filo Apicomplexa (Monis e Thompson, 2003).

Os esporozoítos liberados do oocisto invadem principalmente as células epiteliais (enterócitos) do intestino delgado e se alojam nas microvilosidades destas células, porém, é importante salientar que o protozoário pode se desenvolver em qualquer célula que apresente microvilosidades, por exemplo, células do epitélio pulmonar, sendo esta a localização mais frequente em aves. (Fayer, 1997; Kosec et al, 2001).

Após a excistação, se inicia a fase de reprodução assexuada e sexuada, com a penetração dos esporozoítos nos enterócitos. O ciclo assexuado caracteriza-se pela maturação dos esporozoítos se desenvolvendo em merozoítos ou merontes podendo ser do tipo I ou II, fase essa mais conhecida como merogonia.

A reprodução dos merozoítos do tipo I ocorre de forma ativa nos enterócitos, podendo assim, após o final do processo, infectar células sadias. Já os do tipo II não se multiplicam, e irão gerar a fase sexuada, conhecida como gametogonia dentro do hospedeiro.

Depois de formados os gametócitos, eles são classificados em gametas masculinos (microgametócitos) e gametas femininos (macrogametócitos). Os microgametócitos são

liberados a partir de um fenômeno denominado de exflagelação fertilizando o macrogametócito originando assim o zigoto, que evoluirá para o estágio de oocisto (Franco, 2001) (Figura 2).

Segundo Thompson (2003), após o desenvolvimento dos protozoários são formados dentro do hospedeiro dois tipos de oocistos: os que possuem parede mais delgada (total de 20,0 % dos oocistos produzidos - responsáveis pela autoinfecção interna), causando um aumento da carga parasitária no mesmo hospedeiro e, os oocistos de parede grossa que são os outros 80,0 % produzidos, sendo estes eliminados pelas fezes do hospedeiro, para o ambiente e já infectantes.

O oocisto de *Cryptosporidium* é muito resistente e sobrevive à maioria dos desinfetantes como álcool, hipoclorito de sódio, fenóis e até mesmo, amônia. Também é resistente à concentração de cloro empregada pelas ETAs, durante a etapa de desinfecção da água (Lima et al., 2003).

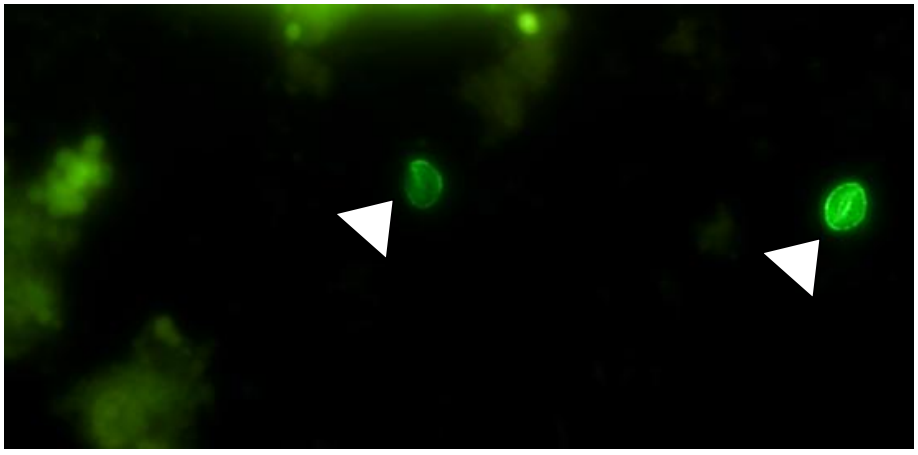


Figura 2: Oocistos de *Cryptosporidium*, ambos com presença de sutura, visualizados por reação de imunofluorescência direta, mediante emprego de anticorpos monoclonais. Fonte: A autora (2016)

A infecção é caracterizada como autolimitante em indivíduos que apresentam o sistema imunológico hígido, mas pode ser grave em imunocomprometidos, sendo frequentemente não diagnosticada. O quadro clínico é bem amplo e influenciado pela idade do hospedeiro, status nutricional e espécie e subtipo causador da infecção (Fayer et al, 1997; Araújo et al., 2007, Leal, 2013). Deve-se ressaltar que o que delimita a severidade da doença é o status imunológico do hospedeiro, especialmente a sua resposta imunológica de tipo celular e concentração de linfócitos T CD4 (O'Connor et al, 2011).

Em indivíduos imunocompetentes, o principal sintoma é a diarreia líquida que tende a ter longa duração (em média 5 - 10 dias), acompanhada de cólicas abdominais, fadiga, náusea, anorexia, perda de peso, febre baixa, vômitos, dores nas articulações e mialgias (Fayer et al, 2000; Hellard et al, 2000; Shirley et al, 2012).

Em indivíduos imunodeficientes ou imunossuprimidos, a infecção se agrava e adquire um caráter oportunista sendo frequente causa de óbitos caso não haja intervenções hospitalares, como hidratação parenteral ou medidas que assegurem o restabelecimento do sistema imunológico (Farthing, 2006; O'Connor et al, 2011). Em pacientes portadores de HIV/ AIDS, a infecção geralmente apresenta-se mais grave quando os níveis de linfócitos T CD4 caem para níveis abaixo de 100 células/mm^3, ocorrendo má-absorção intestinal, significativa perda de peso e elevado coeficiente de fatalidade (Cabada e White, 2010; O'Connor et al, 2011, Leal, 2013).

Nesta situação, há o risco do desenvolvimento de criptosporidiose fulminante; existe registro de pacientes que apresentaram diarreia e desidratação extremamente aguda com eliminação de 17 a 20 litros de fezes aquosas em apenas um dia (Griffiths, 1998).

Manifestações extra-intestinais ocorrem mais frequentemente em indivíduos imunossuprimidos e indicam um mau prognóstico da doença: acometem os dutos biliares (com aparecimento de colangite), fígado, pulmão, e quadros graves de pancreatite (Fayer et al, 1997; Denkinger et al, 2008, Leal, 2013).

Segundo Bern e colaboradores (1992) a diarreia aguda e a desidratação são uma das principais causas de mortalidade infantil, causando cerca de 3,3 milhões de mortes por ano, em uma escala global. Dados mais atuais de casos de diarréia severa em crianças, de acordo com estudo coordenado pelo grupo GEMS (Estudo Multicêntrico de Patógenos Entéricos Global) (Kotloff et al, 2013), apontam a diarréia como a segunda principal causa de óbitos, em diversos países da África e Ásia, e o *Cryptosporidium* como a segunda causa de diarréia severa na infância, somente sobrepujado pelo rotavírus (Ryan et al, 2016).

No Brasil, alguns dados revelaram que até 17,0 % dos casos de gastroenterite infantil estavam associados à criptosporidiose (Gennari-Cardoso et al.,1996).

A criptosporidiose apresenta distribuição cosmopolita e os dados de prevalência, são variáveis. Em populações não portadoras de HIV com diarréia, em nações desenvolvidas, a prevalência varia entre 0,3 % e 4,3 % e, nos países em desenvolvimento, entre 1,3 e 22,2 %. Na população infectada pelo HIV, esses índices são maiores, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde cerca de 50,0 % das diarreias são causadas pelo

Cryptosporidium. Nos países desenvolvidos esse índice varia entre 8,0 % e 30,0 % (Andrade Neto & Assef, 1996).

Em estudo realizado em pacientes portadores do vírus HIV, na região do triângulo mineiro, entre os anos de 1993 e 2003, evidenciou-se a ocorrência de criptosporidiose em 9,47 % dos pacientes (Silva et al, 2004). Estes dados estão abaixo do que já foi relatado em outras regiões do país que assinalam uma ocorrência em torno de 12,1 e 19,1 % (Dias et al., 1988; Moura et al., 1989).

Em outro estudo, de Silva e colaboradores (1994) relataram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em 2,8 % das amostras de fezes diarréicas analisadas em Alfenas, Minas Gerais, principalmente entre indivíduos de 0 - 6 anos de idade e, residentes de área urbana. Em âmbito global, acredita-se que haja uma grande variação de prevalência da parasitose, inclusive, que está esteja subestimada, pois os métodos de diagnóstico são variados, a notificação não é universalmente obrigatória e, muitos indivíduos doentes não procuram assistência médica (Xiao & Fayer, 2008; Baldursson & Karanis, 2011; Ryan et al, 2016).

Quanto às principais espécies que acometem os seres humanos, tanto em imunocompetentes quanto em imunocomprometidos, são: *C. hominis, C. parvum, C. meleagridis, C. felis e C. canis.* Casualmente, outras poucas espécies e genótipos de *Cryptosporidium* são encontrados em humanos, como *C. muris, C. suis, C. andersoni, e Cryptosporidium cuniculus* (Xiao & Fayer, 2008; Zahedi, 2016).

No Brasil, embora as informações sejam ainda escassas, já foi verificada a ocorrência desses microrganismos em água para consumo humano, embora sem evidência

epidemiológica da doença na comunidade servida, porém, o protozoário tem sido detectado com agente etiológico de surtos em crianças que frequentam creches (Newman et al., 1993; Franco, 2007).

Apesar do avanço das pesquisas e conhecimento acerca do protozoário parasito, muitas perguntas ainda não foram sanadas quanto a sua epidemiologia e também ao tratamento que possa ocasionar a cura parasitológica. Até hoje, inexiste uma vacina contra a doença e, o único fármaco aprovado para o tratamento da diarreia causada pela criptosporidiose é a nitazoxanida (NTZ), recomendada pela FDA para administração em crianças, embora ela não promova a cura e somente diminua os episódios de diarréia e o número de oocistos a serem eliminados pelas fezes (Platts-Mills, 2015; Gates et. at, 2016).

Os estudos atuais têm focado na genotipagem dos isolados, especialmente quando ocorrem surtos de veiculação hídrica. A rastreabilidade das fontes de contaminação fecal em águas de recreação tem sido efetuada, pois numerosos surtos estão ocorrendo em escala mundial, especialmente em piscinas,

Ademais, existe a necessidade de monitoramento de protozoários patogênicos em áreas costeiras e estuarinas visto que a presença de animais e o lançamento de esgoto doméstico *in natura* podem ocasionar surtos em banhistas e nadadores.

4.3 Gênero Giardia

Em 1681, Antonie van Leeuwenhoek, analisando suas próprias fezes diarréicas em microscópio encontrou o protozoário, que mais tarde seria conhecido como *Giardia duodenalis* (sinonímia *G. lamblia*, *G. intestinalis*) (Dobell, 1920 *apud* ADAM, 2001).

Já no ano de 1859, a morfologia do protozoário foi descrita por Lambl e considerou que o parasito pertencia ao gênero *Cercomonas,* classificando-o como *Cercomonas intestinalis*, devido à sua localização no hospedeiro (Lambl, 1859 *apud* Adam, 2001).

Com o passar dos anos, o protozoário foi ganhando muitas outras nomenclaturas: Blanchard em 1888 nomeou o mesmo de *Lamblia intestinalis* (Blanchard, 1988 *apud* Adam, 2001); no ano de 1902, Stiles acabou modificando o nome para *Giardia duodenalis* (Stiles, 1902 *apud* Adam, 2001).

Em 1952 Filice resolveu separar as diferentes espécies com base nas características morfológicas dos trofozoítos e de acordo com sua especificidade de hospedeiros.

Segundo a classificação estabelecida pelo comitê de protozoologistas (Levine, 1980) esse protozoário flagelado está entre os do Filo Sarcomastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Diplomonadida e pertencendo à família Hexamitidae.

Atualmente, a *Giardia* esta classificada no supergrupo Excavata, primeiro rank Fornicata, segundo rank Eopharyngia: Diplomonadida: Giardiinae (ADL et al, 2005).

Giardia é um dos mais antigos organismos eucariotos conhecidos. O parasito apresenta capacidade de infectar um grande número de hospedeiros, entre eles, animais de diversas classes de vertebrados, mamíferos, aves e répteis (Ortega e Adam, 1997; Appelbee, 2005).

Existem seis espécies descritas, que atualmente são denominadas de *G. microti* (infecta rato almiscarado e rato calunga); *G. psittaci* (aves - psitacídeos), *G. ardeae* (aves silvestres); *G. agilis* (anfíbios); *G. muris* (roedores) e *G. duodenalis* (humanos; mamíferos domésticos e silvestres) (Thompson, 2004; Koehler et al, 2014).

A única espécie com potencial patogênico para o ser humano é *Giardia duodenalis*, sendo a maior parte dos estudos documentados na literatura, concernentes a esta espécie.

Em 2004, Thompson descobriu que *Giardia duodenalis*, é na verdade um complexo de espécies, as quais exibem variedades genotípicas e fenotípicas distintas, revelando que exemplares dessa espécie não são uniformes, mesmo os que apresentam genótipos equivalentes e morfologicamente similares, apresentam diferenças em sua especificidade parasitária.

Portanto de acordo com os genótipos ou assembleias (n = 8) foram divididas em diversos grupos (A – H), sendo os genótipos A e B, capazes de infectar os seres humanos e, os demais, com predileção para especificidade parasitária, isto é hospedeiro específico de diversos animais (Koehler et al, 2014) (Tabela 3).

Tabela 3: Espécies e genótipos do gênero *Giardia*.

Espécie	Genótipo	Hospedeiros principais	Tamanho dos Cistos (µm)	Referencias
Giardia duodenalis (= G. lamblia; G. intestinalis)	A	Humanos e outros primatas, canídeos, felinos, bovinos, roedores, animais silvestres.	12-15 x 6-8	Homan et al., 1992; Mayrhofer et al., 1995
	B	Humanos e outros primatas, canídeos, animais silvestres.	12-15 x 6-8	Homan et al., 1992; Mayrhofer et al., 1995
	C	Canídeos	12-15 x 6-8	Meloni & Thompson, 1987
	D	Canídeos	12-15 x 6-8	Monis et al., 1998
	E	Bovinos e animais de pastoreio (herbívoros)	12-15 x 6-8	Ey et al., 1997
	F	Felinos	12-15 x 6-8	Monis et al., 1999
	G	Roedores	12-15 x 6-8	Monis et al., 1999
G. agilis	--	Anfíbios	20-30 x 4-5	Kunstler, 1882, 1883
G. muris	--	Roedores, aves e répteis.	9-12 x 5-7	Grassi, 1879
G. psittaci	--	Aves	14 x 6,0	Erlandsen & Bemrich, 1987
G. ardeae	--	Aves	10 x 6,5	Erlandsen et al., 1990
G. microti	--	Roedores	12-15 x 6-8	Feely, 1988

*Genótipo H descrito em animais marinhos. Aceito por grande parte dos autores

Fonte: Leal, 2013.

Quanto à morfologia do protozoário *Giardia*, apresenta apenas o trofozoíto e o cisto como estádios evolutivos em seu ciclo de vida.

O cisto (Figuras 3 e 4) de tamanho variando entre 8 a 12 µm tem a forma ovalada e apresenta resistência ambiental. É formado por dupla parede cística, podendo conter de 2 a 4 núcleos, axonemas e corpos em crescente.

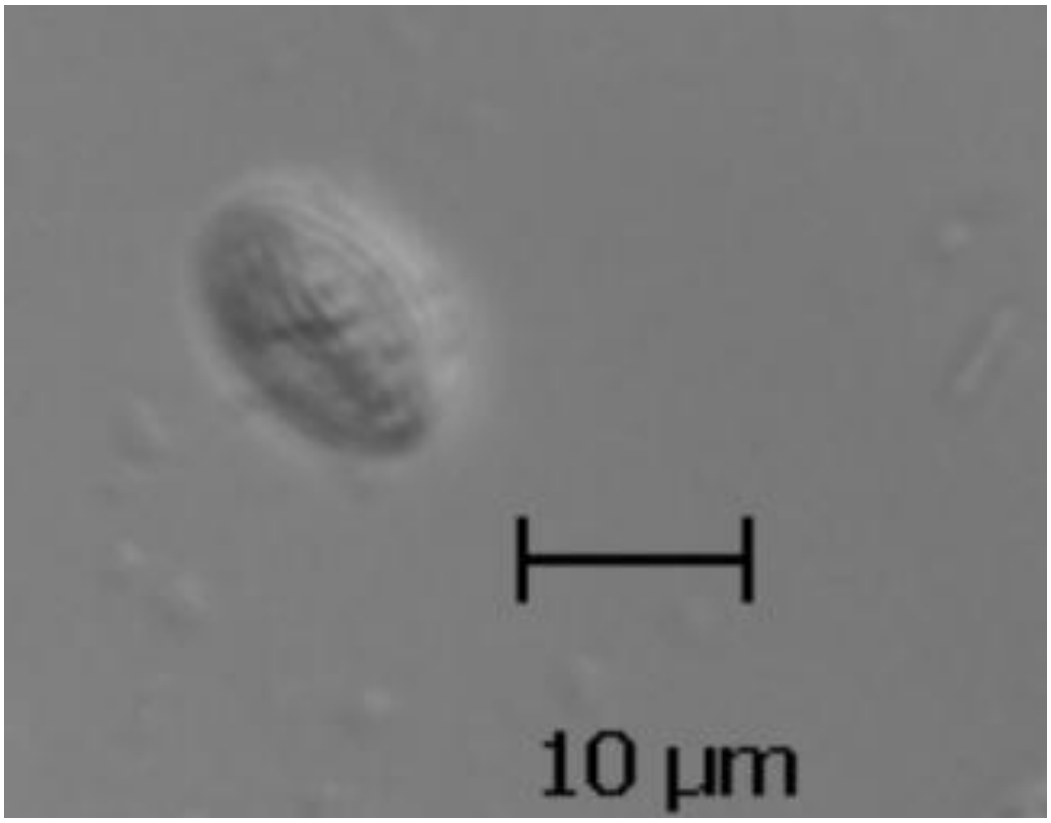


Figura 3: Cisto de *Giardia* visualizado por microscopia de contraste de interferência (DIC).
Fonte: A autora (2016).

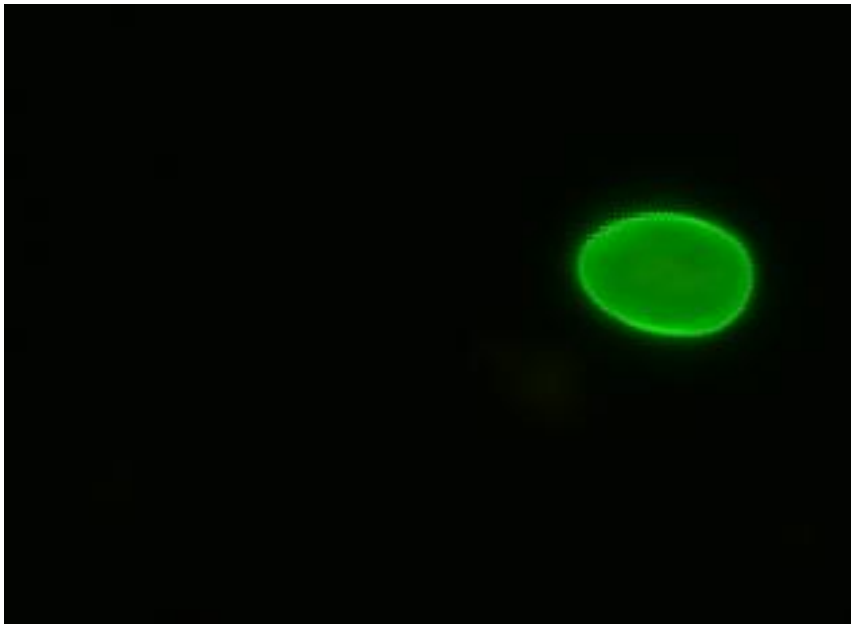


Figura 4: cisto de *Giardia*, visualizado por reação de imunofluorescência direta, mediante emprego de anticorpos monoclonais. Fonte: A autora (2016).

O trofozoíto surge após a passagem do cisto pelo estômago do hospedeiro, sendo que a presença de ácidos estomacais é imprescindível para a excistação do patógeno e desenvolvimento do trofozoíto no intestino delgado (preferencialmente no jejuno e íleo) do hospedeiro. Esta é a forma que se alimenta e se reproduz no hospedeiro (Adam, 2001).

O trofozoíto apresenta quatro pares de flagelos, tem formato elipsoide ou piriforme, de tamanho variando de 12 a 15 µm, com dois núcleos e apresenta corpos medianos, axonemas e um disco ventral côncavo, também denominado de disco adesivo, constituído de microtúbulos, ajudando na fixação do patógeno na mucosa do lúmen intestinal do hospedeiro, para se multiplicar (Ortega e Adam, 1997; Thompson, 2004; Ali e Hill, 2003; Lane e Lloyd, 2002).

Existem casos em que a giardiose pode ser assintomática, porém, quando sintomática, pode ocasionar náuseas, diarreia crônica ou aguda, distensão abdominal, flatulência, anorexia e perda de peso (Adam, 2001).

A diarreia crônica é caracterizada por fezes diarreicas, perda de peso, dor abdominal, mal estar e má-absorção intestinal, sendo muito desses sintomas similares aos sintomas da síndrome do intestino irritável.

Os processos patogênicos, hoje bem elucidados como um mecanismo inflamatório mediado por mastócitos e liberação de histamina, contribui para a má absorção de lipídeos e vitaminas lipossolúveis, que podem aparecer nas fezes (esteatorreia) (Olivares et. al, 2002; Stark et, al, 2007).

A sintomatologia depende ainda de características do hospedeiro, como idade, condição nutricional, dose infectante do patógeno, deficiência de IgA congênita ou adquirida, a virulência inerente as diferentes cepas e, possivelmente, repetidas infecções pelo protozoário no mesmo hospedeiro (Ali e Hill, 2003).

Em 2002, Scott e colaboradores perceberam que em crianças, a presença do parasito pode ser ainda mais danosa, pois a giardíase por causar uma alteração da permeabilidade epitelial aos nutrientes e vitaminas, apresentando níveis de vitaminas (como a B12) menores do que em pessoas saudáveis, devido à má absorção intestinal, tendo como principal consequência, a falha no desenvolvimento físico e cognitivo.

O tratamento pode ser realizado por diversos fármacos, mas o que demonstrou maior eficácia em seres humanos foi o metronidazol com taxas de 60,0 % a 98,0 % de cura (Ortiz et. al, 2001; Manfroi et. al, 2009; Rockwell et. al, 2002; Alizadeh et. al, 2006; Misra et. al, 1995). Já em estudo efetuado em roedores, com a utilização de outros fármacos, encontrou eficácia de cura de 94,0 % mediante utilização de albendazol com secnidazol

78,1 % e um fármaco recentemente encontrado que apresentou 87,0 % de taxa de cura, a nitazoxanida (Franco et. al, 2012).

A prevalência da giardíase varia entre 20 e 30,0 % nos países em desenvolvimento, acometendo 14,6 até 78,3 % das crianças brasileiras (Lallo et. al, 2007). De forma geral, somente os indivíduos sintomáticos são submetidos ao tratamento, de modo que os portadores assintomáticos apresentam grande significado para a saúde pública, por atuarem como disseminadores de cistos (Ortega, 1997; Thompson, 2000).

A veiculação hídrica tem se mostrado um bom fator de transmissão desse patógeno, mesmo em água tratada destinada a consumo humano há relatos da presença de cistos. Os cistos são resistentes à cloração da água, sendo então a remoção na etapa de floculação e filtração da água, as mais indicadas para a sua remoção (Heller et. al, 2004).

Giardia duodenalis é responsável por cerca de 35,0 % dos mais de 199 surtos de veiculação hídrica causados por protozoários no mundo no período de 2004 a 2010 (Baldursson & Karanis, 2011).

Na Noruega, ocorreu um dos maiores surtos de giardiose documentados entre os anos 2004 e 2005 no outono e inverno, acometendo cerca de 1500 pessoas. O esgoto doméstico foi a principal fonte de contaminação, que adentrou uma ETA, onde o tratamento de água era limitado à cloração, sem filtração, etapa essa importante para a retenção de protozoários patogênicos (Robertson et. al, 2006).

4.4 O litoral paranaense

A região do litoral do Paraná é composta por apenas sete municípios e é responsável por apenas 3,0 % do território total do estado do Paraná. Apresenta tamanho desigual na divisão dos territórios com Guaraqueçaba com 2159,3 km² e matinhos sendo a menor área, totalizando com 111,5 km² (IBGE, 2016). Sendo as cidades não muito distantes da capital paranaense - a maior distância encontra-se entre Curitiba-Guaraqueçaba (158 km) e a menor distância da capital pra Antonina, sendo necessário apenas 63 km a serem percorridos, o que facilita o fluxo de turistas urbanos para cidades da costa.

O Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE), em 2016 concluiu que o estado do Paraná é o sexto mais populoso do Brasil e apresenta distribuição geográfica irregular, com a capital paranaense disparada como a cidade mais populosa do estado.

A cidade litorânea de Paranaguá, com um dos maiores índices demográficos, é a que tem melhor estabilidade socioeconômica e tem grande representatividade portuária para o estado, apresentando-se como a segunda cidade mais populosa do litoral. De forma discrepante, Guaraqueçaba o maior município apresenta o menor contingente populacional.

Essa densidade populacional se torna muito variável durante o verão e Carnaval, pois o afluxo de turistas cerca de (1,5 milhão de pessoas) migram para as praias do estado nesta época (Levantamento feito pela empresa de pedágio, baseado pelo fluxo de carros com destino ao litoral em 2002). Essa região expressa grandes variações quanto à atividade econômica principal, mesmo representado apenas 1,57 % do Produto Interno Bruto (PIB) do estado, essas atividades se estendem desde o domínio pesqueiro até

agricultura, fazendo as cidades praianas depender da sazonalidade turística (Estades, 2003).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Levantamento de dados e de bibliografia em periódicos

Para submeter o projeto a editais de fomento e conhecer as metodologias utilizadas em outros trabalhos, realizamos uma revisão bibliográfica nos seguintes bancos de dados: *Google Scholar, Scopus, Scielo, PubMed, NCBI*, utilizando as palavras chaves: *Giardia*, *Cryptosporidium,* água do mar, água marinha, água salina, moluscos bivalves, doenças de veiculação hídrica, saneamento, praia.

5.2 Pontos de Coleta Amostral

AS coletas foram realizadas em duas praias do litoral paranaense. O Instituto Ambiental do Paraná é o órgão responsável pelo monitoramento da qualidade das praias e de sua balneabilidade.

As praias conhecidas como Caiobá e Matinhos foram selecionadas contemplando os devidos pontos já utilizados e georreferenciados por essa instituição.

Em cada praia, foram selecionados dois pontos de amostragem:

Praia 1: Matinhos
- **Ponto 1: Rio matinhos**
- **Ponto 2: Água do mar de matinhos**

Praia 2: Caiobá
- **Ponto 3: Rio de Caiobá**
- **Ponto 2: Água do mar de Caiobá**

Figura 5: Localização dos pontos de coletas das amostras nas praias de Matinhos e Caiobá, litoral do Paraná.

5.3 Coleta das amostras de água

Foram coletados volumes de 10 L de água do mar e de água do rio em galões previamente tratados com solução de eluição Tween 80 (0,1 %), a aproximadamente 30 cm de profundidade para posterior análise posterior em laboratório.

Os procedimentos de coleta das amostras foram realizados com a utilização de luvas e uma corda para alcançar os pontos de difícil obtenção. Os galões foram devidamente identificados de acordo com o ponto amostral, e as amostras acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas para o laboratório de Protozoologia da Universidade Federal do Paraná

5.4 Processamento das amostras hídricas para a pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia*

As amostras de água do mar e rio foram processadas pela técnica de filtração em membrana de ésteres mistos de celulose (47 mm de diâmetro, porosidade nominal de 3µm de acordo com Franco et al., 2001. O sistema de filtração utilizado foi a bomba de vácuo ajustada a um fluxo de 0,4 a 4 L / min e porta–filtro Millipore®.

Após a filtração, as diversas membranas foram cuidadosamente retiradas e colocadas em placas plásticas estéreis para realizar a etapa de recuperação de cistos e oocistos eventualmente presentes nas amostras. Para tanto, a superfície das membranas foi raspada durante 10 minutos com alça plástica macia seguida de lavagens manuais (10 minutos) com solução surfactante (Tween 80, 0,1 %) (Figura 6).

O líquido resultante da etapa de eluição foi transferido para tubos cônicos e concentrado por centrifugação (1.500 x *g* por 15 minutos), seguindo as modificações propostas pelo método 1623.1 da USEPA (United States Environmental Protection Agency) (USEPA, 2012). O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante lavado em destilada e, novamente submetido à centrifugação, nas mesmas condições. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento desta segunda centrifugação foi transferido para tubos de microcentrifuga e mantido sob refrigeração à 4 ºC até a realização da pesquisa de cistos e oocistos por Reação de Imunofluorescência Direta (RID).

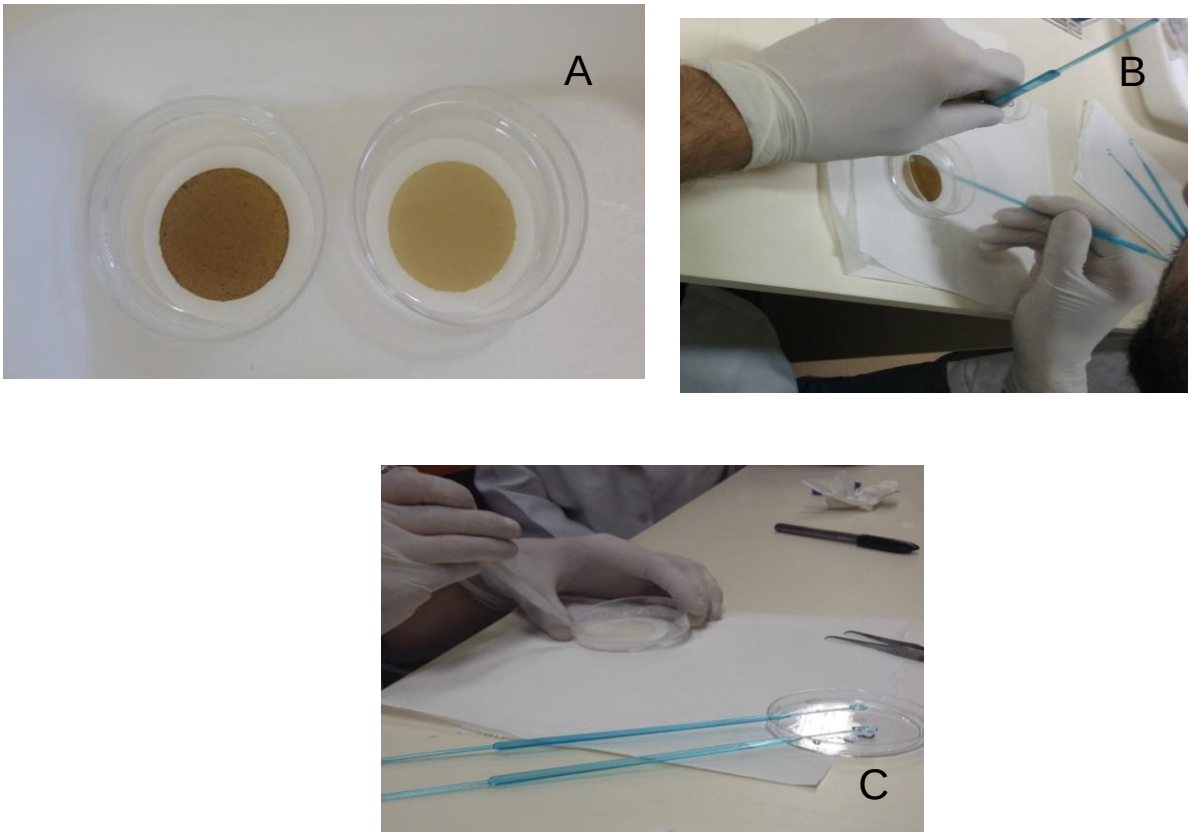


Figura 6: Procedimento de eluição das membranas: A - membranas após a filtração das amostras; B - raspagem das membranas seguida de C – lavagem das membranas.

5.4.1 Visualização dos parasitos por reação de imunofluorescência direta (RID).

As diversas amostras de água do mar e de rio foram analisadas por imunofluorescência direta. As lâminas foram feitas a partir do procedimento operacional padronizado de reação imunofluorescência direta, para identificar o estágio evolutivo de (oo)cistos dos gêneros de *Cryptosporidium* e *Giardia* com a utilização de anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* mediante marcação dos protozoários pelo fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC).

Para tanto, as amostras foram agitadas em vórtex Phoenix® AP- 56 por 2 minutos e, a seguir, invertidas 3 vezes com o propósito de tornar a distribuição de cistos e oocistos homogênea no tubo de microcentrifuga. Após a homogeneização, 10 µL de cada amostra foram cuidadosamente espalhados nos poços das lâminas de imunofluorescência.

Após secagem por 30 minutos em temperatura ambiente, o material foi fixado com a adição de 10µL de metanol, para a realização de RID empregando o kit Merifluor® (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnatti, Ohio).

Após 10 minutos, foi acrescentada uma gota do reagente de detecção contendo os anticorpos monoclonais (Figura 7) e uma gota do contra corante, sendo as preparações mantidas em câmara úmida e protegidas da luz durante 30 minutos em placas de Petri.

A seguir, foi realizada uma lavagem utilizando-se a solução tampão fosfato (pH 7,5) presente no kit Merifluor®, previamente diluída (1: 20) para retirar o excesso de anticorpo. Finalmente, cada lâmina recebeu o meio de montagem e lamínula.

A visualização dos protozoários pela RID foi feita em microscópio Zeiss Observer. Z1 de epifluorescência (Figura 8) equipado com um filtro de excitação na faixa de 450 a 490 nm e filtro de barreira de 520 nm, além de filtro para luz UV, empregado no teste confirmatório da morfologia dos protozoários e DIC (contraste de interferência diferencial).

Os critérios de positividade adotados serão os preconizados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, de acordo com a versão mais recente do método 1623.1 (USEPA, 2012). Para oocistos considerou-se: o tamanho (3 - 8,5 µm) e o formato (ovóides a esféricos), a presença de sutura e, o grau e intensidade de fluorescência verde–maçã brilhante predominante na parede dos oocistos de maneira uniforme, formando um anel típico.

Para os cistos, os critérios de positividade foram o tamanho (8 – 12 µm) e o formato (ovóide), a presença de axonemas e, o grau e intensidade de fluorescência verde–maçã brilhante predominante na parede dos cistos, de maneira uniforme, formando um anel típico.

Além dos critérios de fluorescência e morfometria, utilizou-se a microscopia de contraste de interferência diferencial, para observação da presença esporozoítos, de corpo residual e aspecto da parede dos oocistos. Para cistos de *Giardia*, levou-se em consideração o número de núcleos (2 a 4), a disposição destes dentro do protozoário, a presença de axonemas e de corpos medianos.

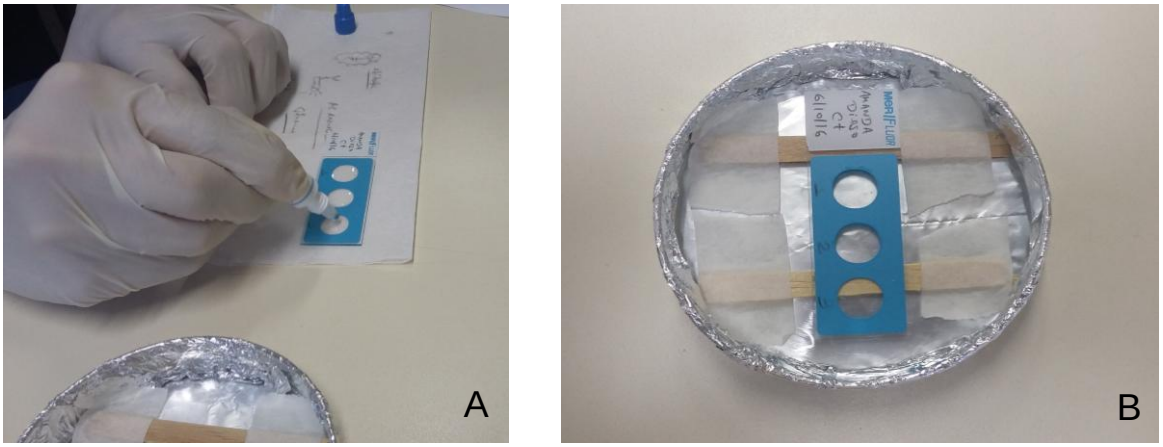


Figura 7: A - Confecção da lâmina e B - lâmina pronta na câmara escura

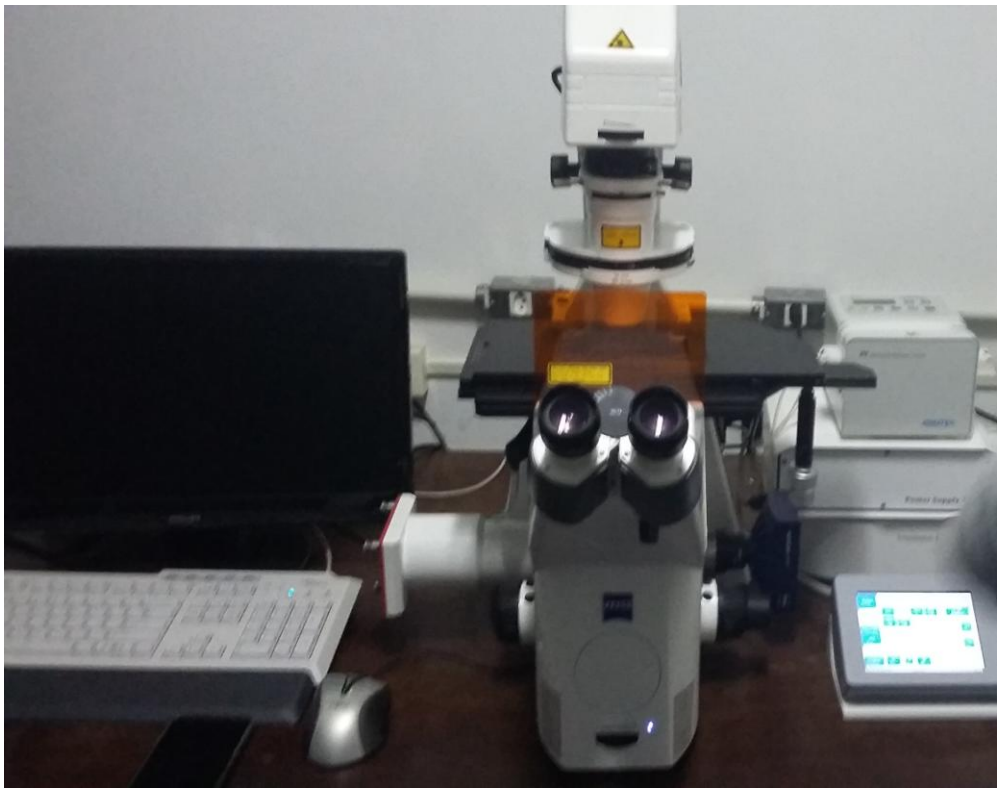


Figura 8: Microscópio Zeiss Observer - Z1

5.4.2 Cálculo do número de oocistos e/ou cistos encontrados por litro na água do rio e na água marinha em situação natural de contaminação

A estimativa do número de cistos e oocistos presentes por litro de água examinada foi calculada da seguinte forma:

$$X = \frac{n}{K} \times \frac{S}{A} \qquad \textbf{(1)}$$

Onde:

X = Concentração de cistos e oocistos/L

n = número de oocistos ou cistos visualizados no poço da lâmina

K = 10 (Volume do sedimento examinado no poço = 10µL)

S = Volume total do sedimento obtido (µL)

A = Volume filtrado da amostra (L)

6. RESULTADOS

6.1 Ocorrência natural dos protozoários na água de rio e mar nas praias de Matinhos e Caiobá.

Todas as amostras hídricas foram analisadas em duplicata por RID. No total, 8 poços (*Wells*) das lâminas de imunofluorescência foram examinados. A tabela a seguir descreve a positividade de protozoários por ponto amostrado.

Tabela 4 Resultados da contaminação por protozoários parasitos em amostras ambientais coletas no litoral do Paraná.

	Ponto 1 (Rio de matinhos)	**Ponto 2 (Mar de Matinhos)**	**Ponto 3 (Rio de Caiobá)**	**Ponto 4 (Mar de Caiobá)**
Réplica 1	Positivo para oocistos de *Cryptosporidium*	ND	ND	ND
Réplica 2	Positivo para oocistos de *Cryptosporidium*	ND	Positivo para oocistos de *Cryptosporidium*	Positivo para oocistos de *Cryptosporidium*

ND = Não detectado.

Das amostras positivas, foi possível contar os oocistos em cada ponto referido, visto que a técnica empregada fornece informações qualitativas e também quantitativas

(detecção do antígeno) considerando que em cada poço da lâmina o volume analisado foi de 10µL de amostra (Tabela 5).

Tabela 5: Número de oocistos de *Cryptosporidium* visualizados por reação de imunofluorescência direta.

	Ponto 1	Ponto 3	Ponto 4
Réplica 1	1 oocisto	_____	_____
Réplica 2	2 oocistos	3 oocistos	3 oocistos

6.2 Concentração de oocistos por litro de amostra.

O volume do sedimento de cada amostra foi mensurado, assim como o volume filtrado por amostra, para aferição da quantidade de parasitos por litro de amostra analisada (Tabela 6).

No Ponto 1, onde detectou-se positividade em ambas as réplicas, o número de oocistos do protozoário encontrado por litro variou de 86,6 a 173,3.

Tabela 6: Concentração de oocistos por litro em diferentes praias do litoral do Paraná.

	Oocistos / L	Volume Filtrado	Volume do Sedimento
Ponto 1 Rio de matinhos (réplica 1)	**86,6**	**1,5 L**	**1,3 mL 1300µl**
Ponto 1 Rio de matinhos (réplica 2)	**173,2**	**1,5 L**	**1,3 mL 1300µl**
Ponto 3 Rio de Caiobá	**170**	**1,5 L**	**0,85 mL 850µl**
Ponto 4 Mar de Caiobá	**124,5**	**2,0 L**	**0,83 mL 830µl**

7. DISCUSSÃO

A utilização de recursos hídricos para fins recreacionais compõe as atividades classificadas como de contato primário como em rios, praias e reservatórios. A busca por estas atividades é o que tem fomentado o turismo, gerado empregos e se tornando uma alternativa econômica para cidades não urbanas e que possuem esse grande atrativo natural como balneários de águas doces e praias.

Entretanto, os impactos antrópicos, de modo continuado, têm contribuído para a contaminação de áreas costeiras e estuarinas, expondo os banhistas a uma série de doenças, que podem ser contraídas durante a recreação. O despejo de esgoto doméstico sem tratamento ou tratado em corpos hídricos, principalmente em rios, é apontado na atualidade como a principal fonte de contaminação por patógenos e deterioração destes ambientes e dos locais onde estes deságuam como as áreas costeiras e estuários (Johnson et al, 1995; Fayer et al, 2004; Leal et al, 2008).

Os principais danos à saúde humana, contraídos mediante atividades recreacionais podem ser classificados como: riscos físicos, microbiológicos e químicos. Particularmente, os riscos de natureza microbiológica estão normalmente relacionados a enfermidades associadas ao uso recreativo da água. O número ou a dose de microrganismos capazes de causar infecção ou doenças depende do patógeno específico, das condições de exposição, da susceptibilidade e do estado imunológico do hospedeiro (WHO, 2003).

As águas recreacionais geralmente contêm uma mistura de microrganismos patogênicos e não patogênicos, sendo a fonte destes microrganismos derivados de esgotos, introduzidos pelos próprios banhistas (defecação, acidentes fecais – crianças que

usam fraldas), contaminação por despejo de fezes por barcos, contaminação por fezes de animais domésticos, de produção ou silvestres e, carreamento / drenagem hídrica de sedimentos que afluem para o mar (Lipp et al, 2001; Fayer et al, 2004; Fayer e Lindsay, 2004; Graczyk et al, 2007; Abdelzaher et al, 2010; Souza et al 2012; Leal et al, 2013; Tei et al, 2016).

A balneabilidade pode ser definida como a classificação da qualidade das águas destinadas à recreação de contato primário, sendo esta entendida como o contato direto e prolongado com a água (natação, mergulho, esqui-aquático, entre outras atividades), onde a possibilidade de ingerir quantidades apreciáveis de água é elevada e, consequente ocorrência de eventuais danos à saúde decorrentes da presença de microrganismos patogênicos (CETESB, 2011).

As legislações brasileiras para aferição da balneabilidade de áreas costeiras de contato primário não preconizam a pesquisa de organismos patogênicos. O padrão de balneabilidade de áreas costeiras no Brasil estabelece que estas devam ser consideradas impróprias para fins recreacionais quando no trecho avaliado for verificada uma das seguintes ocorrências na última amostragem: - 2500 coliformes termotolerantes/ 100 mL ou 2000 *Escherichia coli* / 100 mL ou - 400 enterococos / 100 mL (BRASIL, 2000).

Quando compara-se a legislação americana com a brasileira, é verificado que a primeira adota critérios mais restritivos de classificação de praias e estuários utilizados para recreação e, portanto, de contato primário para o ser humano: a média geométrica da concentração de enterococos, não deve ultrapassar 35 NMP / 100 mL, enquanto que no Brasil é preconizado o valor de 400 NMP /100 mL (BRASIL, 2000; USEPA 2003).

Classicamente, a utilização de indicadores microbiológicos de contaminação fecal suscita questionamentos quanto à capacidade de predizer a contaminação por cistos e oocistos dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* em ambientes marinhos e aquáticos; em grande número de estudos, não se constatou correlação entre as concentrações de bactérias e a ocorrência de protozoários, inclusive em situações importantes, quando da ocorrência de surtos como o ocorrido em Milwaukee, EUA (Mackenzie et al., 1994; Ho e Tam; 1998; Ortega et al., 2009; Helmi et al., 2011, Leal, 2012).

Estudos que enfoquem a contaminação de áreas costeiras e estuarinas por protozoários zoonóticos encistados ainda são escassos no país. Em adição, não existem dados da ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* no litoral do Paraná. Desta forma, o presente projeto é pioneiro na avaliação da contaminação por estes protozoários parasitos em praias destinadas à recreação humana no estado do Paraná.

No presente estudo, oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em três dos quatro pontos amostrados, em concentrações que variaram de 86,6 a 173,2 oocistos / litro, quer seja na água de rios, córregos e línguas negras, que afluem para o mar, ou na própria água do mar. As elevadas concentrações detectadas são consideradas preocupantes, pois demonstram o impacto da poluição fecal nas praias de Matinhos e Caiobá e possibilidade de aquisição da parasitose mediante contato recreacional nestes locais, constituindo um risco à saúde pública.

Deve-se destacar que a presença de apenas um oocisto do protozoário é capaz de iniciar a infecção em categorias populacionais mais vulneráveis (imunossuprimidos e imunodeficientes), representando um risco para esta população (ROSE et al, 2002).

Um importante fator a ser considerado quanto à relevância do monitoramento do protozoário *Cryptosporidium,* pelas legislações que regem a balneabilidade no Brasil e também no mundo concerne ao longo tempo de manutenção da infectividade dos oocistos nestes ambientes. Fayer et al (1998) demonstraram a manutenção da capacidade infectante de oocistos de *Cryptosporidium parvum* mantidos em aquário marinho por até 12 semanas, sob diferentes concentrações de salinidades após administração por intubação gástrica em camundongos BALB/c.

Oocistos mantidos por 12 semanas em salinidades de 10, 20 e 30 ppt a 10 ºC infectaram os camundongos assim como aqueles mantidos a 20 ºC em salinidade de 10 ppt continuaram infectantes por 12 semanas, a 20 ppt por 4 semanas e a 30 ppt por 2 semanas. Em condições muito mais extremas de salinidade (35,0 %), 18,5 % dos oocistos de *C. parvum*, mantidos em aquário marinho por até 40 dias a 18ºC, foram capazes de infectar camundongos *Swiss*, embora grande parte estivesse com a morfologia distorcida antes da administração para os animais (FREIRE-SANTOS et al, 1999).

Porém, Tamburrini e Pozio (1999), legitimaram que o potencial infectante dos oocistos em água do mar não pode ser subestimado e, que definitivamente podem constituir risco aos nadadores em áreas recreacionais ou mediante o consumo de bivalves *in natura*, pois oocistos de *C. parvum* mantidos em água do mar com salinidade de 33 ppt e temperatura de 6 a 8 ºC foram capazes de infectar camundongos *BALB/c* mesmo após 9 e 12 meses de armazenamento nestas condições.

Até o presente momento, cistos de *Giardia* não foram detectados em nenhum ponto amostrado do presente estudo, seja em água do rio ou água do mar. Entretanto, considera-se que apenas uma coleta de água por ponto, foi feita até o momento.

Além disso, é importante salientar que a contaminação por qualquer patógeno em ambientes aquáticos é considerada por muitos autores intermitente e variam em função da qualidade da água.

Miller et al. (2005) documentaram esta variabilidade ao monitorarem durante dois anos a contaminação de bivalves por *Cryptosporidium* e *Giardia* utilizando a reação de imunofluorescência direta aliada a separação imunomagnética e também a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) na Califórnia (EUA). No primeiro ano de amostragem (2002), todos os animais foram negativos para os protozoários. Já no ano seguinte, ambos os protozoários foram detectados.

Ressalte-se que a sensibilidade média da metodologia utilizada para a pesquisa de protozoários mediante utilização da filtração em membranas seguida da visualização por reação de imunofluorescência direta para a detecção de cistos e oocistos em água do mar é de 91,1 % e 54,0 % respectivamente (LEAL, 2008), porcentagens de recuperação maiores do que os valores mínimos preconizados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos para a pesquisa dos protozoários em água bruta (USEPA, 2012).

A contaminação por ambos os protozoários patogênicos em outras localidades da costa brasileira já foram documentadas. Em água marinha de uma praia do litoral norte de São Paulo frequentada pela população autóctone e por turistas, oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em 40,0 % das amostras analisadas - concentrações de 45 a 180 oocistos / L e cistos de *Giardia* em 20,0 % das amostras em concentrações de 50 a 95 cistos / L (Leal, 2008).

Deve-se salientar a importante contribuição da introdução de microrganismos patogênicos exercida por pequenos cursos de água que chegam até as praias, visto que usualmente recebem despejo de esgotos não tratados, inclusive de residências (Dwight et al, 2002; Fayer et al, 2004).

No estudo conduzido na praia do camaroeiro (Litoral de São Paulo), também evidenciou-se importante contribuição de cursos d'água e de rios afluindo para o mar, como importante fonte de introdução e contaminação da água do mar por protozoários patogênicos. Do total de amostras analisadas, 66,6% continham cistos de *Giardia*. O número de cistos do protozoário encontrado por litro variou de 30,7 a 184,6. Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em 8,3 % do total amostrado (concentração de 76,9 oocistos / L) (Leal, 2008).

Este fato foi comprovado no presente estudo, onde a frequência de contaminação foi maior nas amostras de água de rio e córregos (Pontos 1 e 3) das praias de Matinhos e Caiobá, sendo inclusive, os pontos onde se encontraram a maior concentração de oocistos por litro, superiores ao estudo supracitado.

Outros estudos realizados no país demonstram que a contaminação por protozoários patogênicos na costa brasileira pode ser ainda mais frequente e apresentar distribuição ubíqua, também nos ambientes salinos ou salobros.

Em Florianópolis, um estudo conduzido por Souza e colaboradores (2012) demonstrou a presença de ambos os protozoários nos ambientes de cultivo de ostras ou nos próprios tecidos dos animais. Após remoção das brânquias de 12 ostras (*Crassostrea gigas*), realização de lavado branquial submetido à purificação por separação imunomagnética

(IMS) e, visualização por reação de imunofluorescência (RID), oocistos de *Cryptosporidium* foram confirmados no *pool* amostrado (Souza et al, 2013). Cistos de *Giardia* foram detectados em um ponto de estuário neste mesmo estudo. A caracterização molecular da espécie e de genótipos (assembléias) mostrou que a contaminação se dera por *Giardia duodenalis*, pertencente ao genótipo A, com possibilidade de infectar seres humanos.

No estado de São Paulo, na região do estuário lagunar de Cananéia, foi realizado um monitoramento anual de espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia duodenalis,* nas principais etapas relacionadas à criação de ostras nativas (*Crassostrea brasiliana*), e etapa de purificação dos tecidos dos bivalves com depuração e luz UV (ultravioleta) destinadas ao consumo humano (Leal et al, 2013).

Giardia duodenalis foi detectada em todos os pontos amostrados, quer seja na água salobra ou em tecidos de bivalves (lavado branquial ou conteúdo líquido interno dos animais mediante amplificação gênica por *Nested*-PCR. O subgenótipo mais frequentemente identificado em todos os pontos, inclusive em ostras destinadas ao consumo humano foi o AII, considerado antroponótico.

Estes resultados demonstraram que a contaminação que prevalece no local provém principalmente do descarte de esgotos domésticos, e com risco de aquisição da parasitose mediante consumo de bivalves *in natura* ou através do contato recreacional, visto que este é um dos principais genótipos capazes de infectar o ser humano.

Em estudos futuros, pretende-se realizar a caracterização molecular dos protozoários patogênicos isolados no presente estudo. Porém, durante as coletas, notaram-se alguns

fatores que podem estar envolvidos como possíveis fontes de contaminação por *Cryptosporidium*: o fluxo de esgoto *in natura* despejado no rio que desagua no mar e, o livre acesso que animais têm às praias, se banhando (Figura 9) e defecando na areia, como possível fonte de contaminação por *C. parvum* ou *C. canis.*

Além disso, no dia da coleta a maré apresentava-se como de enchente (maré alta), ou seja, havia um grande volume de água marinha em contato com a água doce podendo diluir e dispersar a presença e o número de patógenos encontrados nas amostras.

Figura 9 presença de cão na água do mar de um dos pontos amostrados durante a pesquisa de protozoários patogênicos.

De acordo com a Companhia de Saneamento do Paraná (Sanepar, 2013), a cidade de Matinhos apresenta um tratamento de esgoto que atende apenas 50,02 % de sua população, porém, existem projetos governamentais para que aumentem esses índices, considerados baixos.

Um trabalho realizado em paralelo a este revelou a presença de ovos de helmintos (*Trichuris* spp. e ancilostomatídeos) na areia dos mesmos pontos referidos, evidenciando contaminação fecal de origem humana ou animal e, provável risco de aquisição de helmintoses na população autóctone ou de turistas que visitam estes locais (Ribeiro, 2016).

Estes resultados permitirão embasamento para futuras decisões estratégicas no desenvolvimento regional, além de auxiliar na estruturação de políticas públicas e proposta de criação de resolução estadual de balneabilidade que contemple organismos patogênicos, dados estes, que serão utilizados no futuro pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP), parceiro no presente estudo.

8. CONCLUSÃO

O presente trabalho documenta pela primeira vez, a ocorrência do protozoário patogênico *Cryptosporidium*, o qual pode exibir caráter oportunista em algumas categorias populacionais mais vulneráveis ou mais expostas, em áreas destinadas à recreação humana do litoral do Paraná. Elevadas concentrações de protozoários parasitos foram detectados nas águas do mar e, também em águas de rio, córregos e outros cursos d'água que afluem para o mar das diferentes praias analisadas.

Considera-se um grande desafio a realização da associação da aquisição de doenças gastrointestinais ao hábito recreacional em ambientes aquáticos. Contudo, a estratégia adequada para prevenção de surtos e desenvolvimento de medidas mitigatórias nestes ambientes, consiste no monitoramento sistemático de patógenos, frequentemente encontrados neste locais, aliados a uma atividade intensa de vigilância epidemiológica, abrangendo o acompanhamento da qualidade da água e a detecção e esclarecimento precoce de casos de infecções em seres humanos.

9. REFERÊNCIAS

ABDELZAHER, A. M.; WRIGHT, M. E.; ORTEGA, C.; SOLO-GABRIELE, H. M.; MILLER, G.; ELMIR, S.; NEWMAN, X.; FLEMING, L. E. Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach. **Appl. Environ. Microbiol.** 76: 724-732, 2010.

ABSHER, T. M.; CALDEIRA, G. A. Caracterização dos parques de cultivo de ostras do litoral do Paraná: aspectos técnico-produtivos e sócio econômicos. In: BARROSO, G. F.; POERSCH, L. H. S.; CAVALLI, R. O. (Org.). Sistemas de cultivos aquícolas costeiros no Brasil: recursos, tecnologias e aspectos ambientais e sócio-econômicos. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. p. 181-192.

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin. Microbiol. Rev.** 14: 447-475, 2001.

ADL, S. M.; SIMPSON, A. G. B.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R. A.; ANDERSON, O. R.; BARTA, J. R.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R. A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T. Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C. E.; LEWIS, L. A.; LODGE, J.; LYNN, D. H.; MANN, D. G.; MCCOURT, R. M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, J.; MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; NERAD, T. A.; SHEARER, C. A.;. SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. W.; TAYLOR, M. F. J. R. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **J. Eukaryot. Microbiol.** 52: 399- 451, 2005.

ALI, S. A.; HILL, D. R.; *Giardia intestinalis*. **Curr. Opin. Infect. Dis**. 16: 453-460, 2003.

ALIZADEH, A.; et al. Albendazole versus metronidazole in the treatment of patients with giardiasis in the Islamic Republic of Iran. **La Revue de Santé de la Méditerranée orientale,** v. 12, n. 5, 2006.

APPELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – Current status and future needs. **Trends. Parasitol**. 21 (8): 370-376, 2005.

ANDRADE NETO, J.L.; ASSEF, M.C.V. Criptosporidiose e microsporidiose. In: **Tratado de Infectologia**. Veronesi, R., 8ª ed. São Paulo: Editora Ateneu, 1170-1172, 1996.

ARAÚJO, A. J. U. D. S., ALMEIDA, M. E. D., & KANAMURA, H. Y. Detecção de *Cryptosporidium meleagridis* em amostras fecais de pacientes HIV positivos no Brasil. **Rev. panam. infectol**, v. 9, n. 2, p. 38-40, 2007.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004-2010. **Wat. Res**. 45: 6603-6614, 2011.

BERN, C. K. R., HEWITT, S. M., CROWE, M. W., NAVIN, A. W., DUGGAN, C., SANTOSHAM, M., KLISH, W. J. The Management of Acute Diarrhea in Children: Oral Rehydration, Maintenance, and Nutritional Therapy. 1992.

BETANCOURT, W. Q., DUARTE, D. C., VÁSQUEZ, R. C., GURIAN, P. L. *Cryptosporidium* and *Giardia* in tropical recreational marine waters contaminated with domestic sewage: estimation of bathing-associated disease risks. **Marine pollution bulletin**, v. 85, n. 1, p. 268-273, 2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução Nº. 274 de 29 de novembro de 2000**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27400.html>. Acesso em: 16 nov. 2011.

CABADA, M. M.; WHITE, A. C. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? **Curr. Opin. Infect. Dis**. 23: 494–499, 2010.

CACCIO` S, THOMPSON RC, MCLAUCHLIN J, SMITH HV: Unravelling *Cryptosporidium* and Giardia epidemiology. Trends Parasitol 2005, 21:430-437.

CEBER, K.; ASLAN, G.; OTAG, F.; DELIALIOGLU, N.; OZTURK, C.; BABUR, C.; EMEKDAS, G. Investigation of *Cryptosporidium* spp. oocysts in tap water, well water, sewage water and sea water in Mersin, Turkey. **Turkiye Parazitoloji Dergisi** 29: 224-228, 2005.

CHAPPELL, C. L.; OKHUYSEN, P. C.; STERLING, C. R.; DUPONT, H. L.; *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers**. J. Infect. Dis**. 173: 232–236, 1996.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANAMENTO AMBIENTAL - CETESB. Relatório de qualidade das praias litorâneas no estado de São Paulo. 2011. São Paulo: CETESB, 2012.

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

DENKINGER, C. M.; HARIGOPAL, P.; RUIZ, P.; DOWDY, L. M. *Cryptosporidium parvum* – associated sclerosing cholangitis in a liver transplant patient. **Transpl. Infect. Dis**. 10: 133–136, 2008.

DIAS, R. M. D. S. MANGINI, A. C. S., TORRES, D. M. A., CORRÊA, M. O. A., LUPETTI, N., CORRÊA, F., CHIEFFI, P. P. Cryptosporidiosis among patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in the county of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 4, p. 310-312, 1988.

DWIGHT, R. H.; SEMENZA, J. C.; BAKER, D. B.; OLSON, B. H. Association of urban runoff with a coastal water quality in orange county, California. **Wat. Environ. Res**. 74: 82-90, 2002.

ESTADES, N. Pi. O litoral do Paraná: entre a riqueza natural e a pobreza social. **Desenvolvimento e meio ambiente**, v. 8, 2003.

FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2014. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. **MICROBIOLOGICAL RISK ASSESSMENT SERIES.** 324 p., FAO/WHO Expert Meeting, 3–7, Headquarters, Rome, Italy, 2012.

FARTHING, M. J. Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. **Nat. Clin. Prat. Gastroenterol. Hepatol.** 3: 436-445, 2006.

FAYER, R.; SPEER, C. A. DUBEY, J. P. The general biology of *Cryptosporidium*. In: FAYER, R. (Ed.) **Cryptosporidium and Cryptosporidiosis**. CRC press, ed. Boca Raton. Florida, 1997. p. 1-42.

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

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection, and identification. **Int. J. Parasitol.** 30: 1305-1322, 2000a.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Vet. Parasitol.** 126: 37-56, 2004a.

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends**. **Parasitol**. 20: 531- 536, 2004b.

FERGUSON, C. M.; COOTE, B. G.; ASHBOLT, N. J.; STEVENSON, I. M. Relationships between indicators, pathogens, and water quality in a estuarine system. **Wat. Res.** 30: 2045-2054, 1996.

FLETCHER, S. M.; STARK, D.; HARKNESS, J.; ELLIS, J. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective**. Clin. Microbiol. Rev**. 25: 420-449, 2012.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO-NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 43: 109-111, 2001.

FRANCO, R. M. B. Protozoários patogênicos de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Rev. Pan. Infect. 9 (4)**: 36-43, 2007.

FRANCO, R. M. B., HACHICH, E. M., SATO, M. I. Z. S., NAVEIRA, R. M. L., SILVA, E. D. C., CAMPOS, M. M. D. C., LEAL, D. A. G. (2012). Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água destinada ao consumo humano, para o atendimento às demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 21(2), 233-242.

FRANCO, R. M. B., BRANCO, N., LEAL, D. A. G. (2012). Parasitologia Ambiental: Métodos de Concentração e Detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Rev. patol. trop,** 41(2), 119-135.

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

GATES B. et al. Accelerate Development of New Therapies for Childhood *Cryptosporidium* Infection, Publicado em: 13 setembro de 2016, Disponível em: <http://gcgh.grandchallenges.org/challenge/accelerate-development-new-therapies-childhood-cryptosporidium-infection-round-18>. Acesso: 25/11/2016.

GÓMEZ-COUSO H, MENDÉZ-HERMIDA F, CASTRO-HERMIDA JA, ARES-MAZÁS E. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. **J Food Prot**; 69:185-190; 2006.

GENNARI-CARDOSO, M. L.; COSTA-CRUZ, J. M.; de CASTRO, E.; LIMA, L. M.; PRUDENTE, D. V. *Cryptosporidium* sp. in children suffering from acute diarrhea at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 91: 551-554, 1996.

GIRONES, R., FERRÚS, M. A., ALONSO, J. L., RODRIGUEZ-MANZANO, J., CALGUA, B., CORRÊA, A. A., HUNDESA, A., CARRATALA, A., BOFILL-MAS, S., Molecular detection of pathogens in water - the pros and cons of molecular techniques. **Wat. Res.** 44: 4325-4339, 2010.

GOLDFARB, J.; TANNOWITZ, H.; GROSSNER, R.;BONANNO, C.; KAUFMAN, D.; MA, P. Cryptosporidiosis: assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Morbid. Mortal. Weekly. Rep**. 31: 589-591, 1982.

GRACZYK, T. K.; MAJEWSKA A. C.; SCHWAB, K. J. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. **Trends**. **Parasitol**. 24: 55-59, 2007.

GREINERT, J. A.; FURTADO, D. N.; SMITH, J. J.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in swimming pool filter backwash water concentrates by flocculation and immunomagnetic separation. **Int. J. Environ. Health. Res.** 14: 395-404, 2004.

GRIFFITHS, J. K. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis. **Adv. Parasitol**. 40: 37-85, 1998.

HELLARD, M. E.; SINCLAIR, M. I. HOGG, G. G.; FAIRLEY, C. K. Prevalence of enteric pathogens among community based asymptomatic individuals. **Gastroenterol. Hepatol** 15: 290-293, 2000.

HELMI, K.; SKRABER, S.; BURNET, J. B.; LEBLANC, L.; HOFFMANN, L.; CAUCHIE, H. M, Two-year monitoring of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* occurrence in a recreational and drinking water reservoir using standard microscopic and molecular biology techniques. **Environ Monit Assess** 179:163–175, 2011.

HELLER, Léo 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.

HO, B. S. W e TAM, T. Y. *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage-contaminated river waters. **Wat. Res. 32**: 2860-2864, 1998b.

IBGE. Censo demográfico. Publicado em: 30 agosto de 2016, Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=41&search=parana>. Acessado em: 25/11/2016.

JEX, A. R., SMITH, H. V., MONIS, P. T., CAMPBELL, B. E., GASSER, R. B. *Cryptosporidium* - biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation**. Biotechnol. Adv.** 26: 304-317, 2008.

JOHNSON, D. C.; REYNOLDS, K. A.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L.; ROSE, J. B. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. **Wat. Sci. Tech**. 31: 439-442, 1995.

JOHNSON, D. C. ENRIQUEZ, C. E., PEPPER, I. L., DAVIS, T. L., GERBA, C. P., ROSE, J. B. Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, poliovirus and Salmonella in marine waters. **Water Science and Technology**, v. 35, n. 11-12, p. 261-268, 1997.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **J. Wat. Health**. 5: 1-38, 2007.

KOEHLER, A. V.; JEX A. R.; HAYDON S.R.; STEVENS M. A.; GASSER R. B. A perspective on diagnostic and analytical tools. Biotechnology Advances. 32 (2014) 280-289.

KOLOREN, Z.; KAYA, D.; AVSAR, C. Detection of *Cryptosporidium* species in the Sea and tap water Samples of Black Sea, Turkey. **J. Parasitol**. 99: 554–557, 2013.

KOSEC, M.; ALCANTARA, C.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Cryptosporidiosis: an update. **Infect. Dis.** 1: 262-269, 2001.

KOTLOFF K. L. , NATARO J.P., BLACKWELDER W.C. , et al. Burden and a etiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. Lancet. 2013;382:209–222.

LANE, S.; LLOYD, D. Current trends in research into the waterborne *Giardia*. **Crit. Rev. Microbiol**. 28 (2): 123-147, 2002.

LALLO, M. A. PEREIRA, A., ARAÚJO, R., FAVORITO, S. E., BERTOLLA, P., BONDAN, E. F. Ocorrência de *Giardia*, *Cryptosporidium* e microsporídios em animais silvestres em área de desmatamento no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1465-1470, 2009.

LEAL, D. A. G., PEREIRA, M. A.; FRANCO, R. M. B., BRANCO, N.; CANTUSIO-NETO, R. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil. **J. Wat. Health**. 6: 527-532, 2008.

LEAL, D. A. G.; RAMOS, A. P. D.; SOUZA, D. S. M.; DURIGAN, M.; GREINERT-GOULART, J. A.; MORESCO, V.; AMSTUTZ, R. C.; MICOLI, A. H.; CANTÚSIO-NETO, R.; BARARDI, C. R. M.; FRANCO, R. M. B. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. **Ocean. Coast. Manag**. 72: 93-100, 2013a.

LEAL, D. A. G. Monitoramento de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. na cadeia produtiva de ostras (*Crassostrea brasiliana*), depuradas para o consumo humano no complexo estuário - lagunar de Cananéia, São Paulo. 2013b.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COS, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, III. J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the protozoa. **J. Protozool**. 27: 37-58, 1980.

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

LIPP, E. K.; FARRAH, S. A.; ROSE, J. B. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. **Mar. Pol. Bull**. 42: 286-293, 2001.

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

LOPES, F. W. A; MAGALHÃES Jr. Avaliação da qualidade das águas para recreação de contato primário na bacia do alto rio das Velhas – MG. HYGEIA - **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde, Uberlândia,** v. 6, p. 133-150. dez/2010. Disponível em www.hygeia.ig.ufu.br. Acesso em: 11 nov. 2016.

MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIR, K. A.; PETERSON , D. E.; KAZMERCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. B.; DAVIS, J. P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **N. Engl. J. Med. 331**: 161-167, 1994.

MAGANA-ORDORICA, D.; MENA, C.; VALDEZ-TORRES, J. B.; SOTO-BELTRAN, M.; LEON-FELIX, J.; CHAIDEZ, C. Relationships between the occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and physicochemical properties of marine waters of the Pacific Coast of Mexico. **J. Wat. Health**. 8: 797-802, 2010.

MANFROI, A.; STEIN, A. T.; CASTRO FILHO, E. D. Abordagem das Parasitoses Intestinais mais Prevalentes na Infância. **Sociedade Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**. v. 8, p. 1-26, 2009.

MAYER, D. C., TEI, F. F., KOWALYK, S., REID, J. A., PRESTA, M. A., YESUDAS, R. Assessment and Molecular Characterization of Human Intestinal Parasites in Bivalves from Orchard Beach, NY, USA. **International journal of environmental research and public health**, v. 13, n. 4, p. 381, 2016.

MEISEL, J. L.; PERERA, D. R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in a immunosupressed patient. **Gastroenterol**. 70: 1156-1160, 1976.

MILLER, Woutrina A. et al. Clams (Corbicula fluminea) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 6, p. 673-684, 2005.
ORTEGA, Y. R.; ADAM, R. D.; Giardia: overview and update. **Clin. Infect. Dis**. 25: 545-549, 1997.

MINISTÉRIO DO TURISMO DO BRASIL. Estudo da demanda turística internacional – Brasil– 2014. Disponível em: http://www.dadosefatos.turismo.gov.br/dadosefatos/demanda_turistica/internacional/ Acesso em: 02/02/2016.

MISRA, P. K.; et al. A Comparative Clinical Trial Of Albendazole Versus Metronidazole In Giardiasis. **Indian Pediatrics**, v. 32, 1995.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. Cryptosporidium and Giardia-zoonoses: fact or fiction? **Infect. Gen. Evol.** 3: 233-244, 2003.

MOORE, M.N; DEPLEDGE, M.H; FLEMING, L; HESS, P; LEES, D; LEONARD, P; MADSEN, L; OWEN, R; PIRLET, H; SEYS, J; VASCONCELOS, V; VIARENGO, A. Oceans and Human Health (OHH): a European Perspective from the Marine Board of the European Science Foundation (Marine Board-ESF). **Microb. Ecol**. 65:889–900, 2013.

MOURA, H. FERNANDES, O., VIOLA, J. P. B., SILVA, S. P., PASSOS, R. H., LIMA, D. B. Enteric parasites and HIV infection: occurrence in AIDS patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 4, p. 527-533, 1989.

NEWMAN, R. D. WUHIB, T., LIMA, A. A., GUERRANT, R. L., & SEARS, C. L. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 49, n. 2, p. 270-275, 1993.

NIME, F. A.; BUREK, J. D.; PAGE, D. L.; HOLSCHER, M. A.; YARDLEY, J. H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterol**. 70: 592-598, 1976.

O'CONNOR, R. M.; SHAFFIE, R.; Kang, G.; Ward, H.D. Cryptosporidiosis in patients with HIV / AIDS. **AIDS**. 25: 549-560, 2011.

OLIVARES, J. L.; FERNÁNDEZ, R.; FLETA, J.; RUIZ, M. Y.; CLAVEL, A. Vitamin B12 and folic acid in children with intestinal parasitic infection**. J. Am. Coll. Nutr**. 21 (2): 109-113, 2002.

OLIVEIRA, G. F. M., DO COUTO, M. C. M., DE FREITAS LIMA, M., & DO BOMFIM, T. C. B. Mussels (*Perna perna*) as bioindicator of environmental contamination by Cryptosporidium species with zoonotic potential. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 5, n. 1, p. 28-33, 2016.

ORTEGA, Y. R.; ADAM, R. D.; *Giardia*: overview and update. **Clin. Infect. Dis**. 25: 545-549, 1997.

ORTEGA-PIERRES, G.; SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C. A. New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. **Trends. Parasitol.** 25: 410-416, 2009.

ORTIZ, J. J.; et al. Randomized clinical study of nitazoxanide compared to metronidazole in the treatment of symptomatic giardiasis in children from Northern Peru. **Aliment Pharmacology & Therapeutics**, v.15, p. 1409-1415, 2001.

PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A**. Biologia marinha.** 1a ed. Rio de Janeiro: Editora interciência; 2002. 382p.

PLATTS-MILLS, JA, et al., "Pathogen-specific burdens of community diarrhea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED)" Lancet Global Health 2015 Sept; 3 (9):e564-75.

RIBEIRO, P. P. **Padronização e Avaliação de Protocolo para Detecção de Ovos de Helmintos em Areia de Praias do Litoral Paranaense.** 76f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba

RIOU, P.; Le SAUX, J. C. DUMAS, F.; CAPRAIS, M. P.; Le GUYADER, S. F.; POMMEPUY, M.; Microbial impact of small tributaries on water and shellfish quality in shallow coastal areas. **Wat. Res**. 41: 2774- 2786, 2007.

ROBERTSON, L. J.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B. K.; STRAND, E.; ALVSVAG, J. O.; LANGELAND, N. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004**. Appl. Environ. Microbiol**. 72: 2212-2217, 2006.

ROBERTSON, L. J.; GJERDE, B. K. *Cryptosporidium* oocysts: challenging adversaries? **Trends. Parasitol.** 23 (8): 344-347, 2007.

ROCKWELL, R. L. *Giardia lamblia* and Giardiasis With Particular Attention to the Sierra Nevada. **Sierra Nature Notes May**, v. 2, n. 2, 2002.

ROSE, J. B.; LISLE, J. T.; LeCHEVALLIER, M. Waterborne cryptosporidiosis: incidence outbreaks, and treatment strategies. In: FAYER, R (Ed.). **Cryptosporidium and Cryptosporidiosis.** CRC press, ed. Boca Raton. Florida, 1997. p. 93-109.

ROSE, J. B.; HUFFMAN, D. E.; GENNACCARO, A.. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 113-123, 2002.

RUGGIERO, M. A.; GORDON, D. P.; ORRELL, T. M.; BAILLY, N.; BOURGOIN, T.; BRUSCA, R. C.; CAVALIER-SMITH, T.; GUIRY, M. D.; KIRK, P. M. A Higher Level classification of all living organisms. **PLoS ONE,** 10: 1-54, 2015.

RYAN, U.; ZAHEDI, A.; PAPARINI, A. *Cryptosporidium* in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 9, p. 535-547, 2016.

SANEPAR: Rede de esgoto no litoral, Publicado em: 16 outubro de 2013, Disponível em: <http://site.sanepar.com.br/noticias/sanepar-sistemas-de-agua-e-esgoto-no-litoral>. Acesso em: 11 nov. 2016.

SCHETS FM, VAN DEN BERG HH, ENGELS GB, LODDER WJ, DE RODA HUSMAN AM. *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, The Netherlands. **Int J Food Microbiol**; 113: 189-194; 2007.

SCOTT, K. G. E.; MEDDINGS, J. B.; KIRK, D. R.; LEES-MILLER, S. P.; BURET, A. G. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain Kinase-depedent fashion. **Gastroenterol**. 123:1179-1190, 2002.

SECRETARIA DE ESTADO DO TURISMO – PARANÁ TURISMO (SETU) Estudo da demanda turística litoral – PR. **Região Turística: Litoral do Paraná em dados**. 2008.

SHIRLEY, D. A. T.; MOONAHB, S. N.; KOTLOFFA, K. L. Burden of disease from cryptosporidiosis. **Curr. Opin**. 25: 555-563, 2012.

SILVA, A. C.; HIRSCHFELD, M. P. M. Ocorrencia do *Criptosporium* spp, em individuos com fezes diarreicas no municipio de Alfenas-MG. **Rev. farm. bioquim. Univ. Säo Paulo**, v. 30, n. 1, p. 33-7, 1994.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne cryptosporidiosis: current status. **Parasitol. Today.** 14: 14-22, 1998.

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; TAIT, A.; McLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends. Parasitol. 22**: 160-167, 2006.

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; COOK, N.; NICHOLS, R. B. A.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and Giardia as foodborne zoonoses. **Vet. Parasitol.** 149: 29-40, 2007.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. *Cryptosporidium*: detection in water and food. **Exp. Parasitol.** 124: 61-79, 2010.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO (2013). Situação do Saneamento no Brasil. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/saneamento-no-brasil> Acesso em: 11/11/2016.

SODRÉ, F. C.; FRANCO, R. M. B. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium***. Rev. Bras. An. Clín**. 33 (2): 97-106, 2001.

SOUZA, D. S. M., RAMOS, A. P. D., NUNES, F. F., MORESCO, V., TANIGUCHI, S., LEAL, D. A. G., TEIXEIRA, A. L. (2012). Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. Ecotoxicology and environmental safety, 76, 153-161.

SRISUPHANUNT, M.; KARANIS, P.; CHAROENCA, N.; BOONKHAO, N.; ONGERTH, J. E. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in environmental waters of southwest coastal areas of Thailand. **Parasitol. Res.** 106: 1299-1306, 2010.

STARK, D. Van Hal, S., Marriott, D., Ellis, J., Harkness, J.. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 1, p. 11-20, 2007.

TAMBURRINI, A.; POZIO, E. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (Mytilus galloprovincialis). **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 5, p. 711-715, 1999.

TEI, F. F. et al. Assessment and Molecular Characterization of Human Intestinal Parasites in Bivalves from Orchard Beach, NY, USA. **International journal of environmental research and public health**, v. 13, n. 4, p. 381, 2016.

THOMPSON, R. C. A.; SMITH, A. Zoonotic enteric protozoa. **Vet. Parasitol.** 182: 70-78, 2011.

THOMPSON, R. C. A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet. Parasitol.** 126: 15-35, 2004.

THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. **Infection, Genetics and Evolution,** v. 40, p. 315-323, 2016.

TOURON, A.; BERTHE, T.; GARGALA, G.; FOURNIER, M.; RATAJCZAK, M.; SERVAIS, P.; PETIT, F. Assessment of faecal contamination and the relationship between pathogens and faecalbacterial indicators in an estuarine environment (Seine, France). **Mar. Pol. Bull**. 54: 1441-1450, 2007.

TYZZER, E. E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Assoc.** 5: 12-13, 1907.

TYZZER, E. E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **J. Med. Res.** 23: 487-511, 1910.

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

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Office of Water. **Bacterial water quality standards for recreational waters (freshwater and marine waters) status report**. EPA-823-R-03-008, 2003.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Office of Water. Washington DC. Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA.** EPA-815-R- 05-002, 2012.

VAUDAUX, J. D., MUCCIOLI, C., JAMES, E. R., SILVEIRA, C., MAGARGAL, S. L., JUNG, C., BELFORT, R. Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivai, Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 8, p. 1226-1233, 2010.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission. **Int. J. Parasitol**. 38: 1239-1255, 2008.

XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U., & UPTON, S. J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical microbiology reviews**, 17(1), 72-97.

ZAHEDI, A., PAPARINI, A., JIAN, F., ROBERTSON, I., RYAN, U. Public health significance of zoonotic Cryptosporidium species in wildlife: critical insights into better drinking water management. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 5, n. 1, p. 88-109, 2016.

WHO: Guidelines for drinking-water quality. Vol 1 Recommendations. Edited by. Geneva: World Health Organization; 2006 [Guidelines for drinking-water quality, vol 1.].

WIEDENMANN, A.; KRÜGER, P.; BOTZENHART, K. PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples- a review of published protocols and current developments. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 21: 150-166, 1998.

WILLIS, J. E., MCCLURE, J. T., DAVIDSON, J., MCCLURE, C., GREENWOOD, S. J. Global occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in shellfish: Should Canada take a closer look?. **Food research international**, v. 52, n. 1, p. 119-135, 2013.

WYN-JONES, A. P; WYER, M. D; KAY, D; AU-YEUNG, H. C; GIRONES, R; LÓPEZ PILA, J; HUSMAN, A. M. R; RUTJES, S; SCHNEIDER, O. Relationships between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational Waters. **Wat. Res.** 46: 4130-4141, 2012.

10. Apêndices

Apêndice 1: Submissão de projeto para o edital da Fundação Araucária (2016).

Projeto PPSUS - EFP_00012772

Dados do Edital

Tipo do fomento	Sigla do Edital
Fomento PPSUS	EFD_00000115

Nome do Edital

Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde: Gestão Compartilhada em Saúde PPSUS Edição 2015 Fundação Araucária-PR / SESA-PR / MS-Decit/ CNPq

Dados do Coordenador do Projeto

Nome do Pesquisador

DIEGO AVERALDO GUIGUET LEAL

Instituição de vínculo do coordenador	Órgão	Unidade
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA	---	---

UF	Município
PR	CURITIBA

Endereço Comercial	CEP	E-mail
RUA XV DE NOVEMBRO - 1299 --- CENTRO	80060000	diego.leal@ufpr.br

Telefone Comercial	Fax
(041) 32642243 ---	(041) 32642243

Dados do Projeto

Sigla do Projeto

EFP_00012772

Título

MONITORAMENTO AMBIENTAL DE PARASITOS NO LITORAL DO PARANÁ COMO INSTRUMENTO PARA ELABORAÇÃO DE PROPOSTA DE LEGISLAÇÃO ESTADUAL DE BALNEABILIDADE.

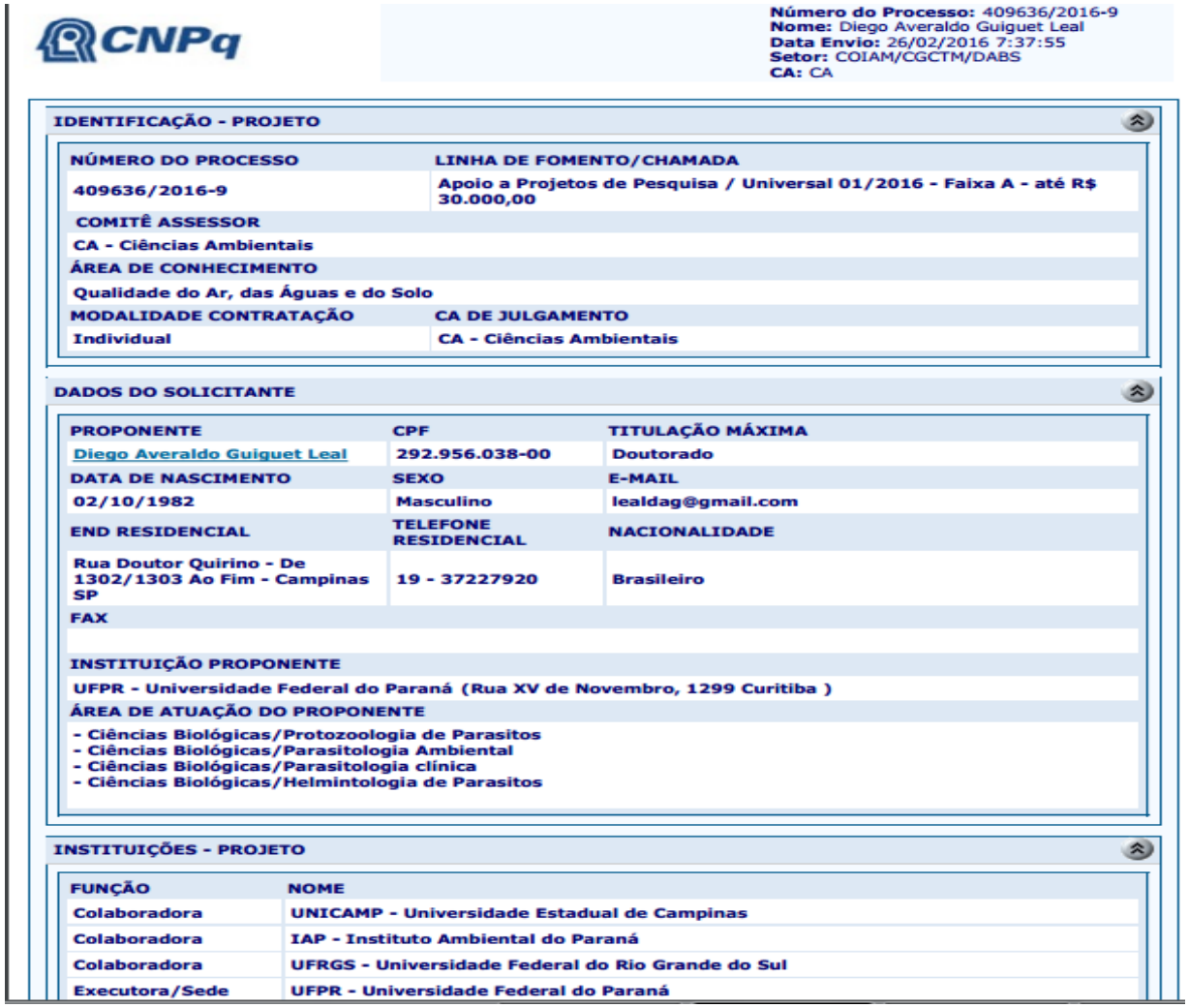
Modalidade de Gestão	Setor de aplicação da Pesquisa
Estudo Multicêntrico	Políticas públicas e saúde

Duração total	Data prevista para início
24 meses	01/12/2016

Pesquisa envolve algum grupo Populacional?	A Pesquisa terá como escopo alguma Área Geográfica?
Não	Sim

Resumo

Apêndice 2: Submissão de projeto para o Edital Universal (2016).



CNPq

Número do Processo: 409636/2016-9
Nome: Diego Averaldo Guiguet Leal
Data Envio: 26/02/2016 7:37:55
Setor: COIAM/CGCTM/DABS
CA: CA

IDENTIFICAÇÃO - PROJETO

NÚMERO DO PROCESSO	LINHA DE FOMENTO/CHAMADA
409636/2016-9	Apoio a Projetos de Pesquisa / Universal 01/2016 - Faixa A - até R$ 30.000,00
COMITÊ ASSESSOR	
CA - Ciências Ambientais	
ÁREA DE CONHECIMENTO	
Qualidade do Ar, das Águas e do Solo	
MODALIDADE CONTRATAÇÃO	**CA DE JULGAMENTO**
Individual	CA - Ciências Ambientais

DADOS DO SOLICITANTE

PROPONENTE	CPF	TITULAÇÃO MÁXIMA
Diego Averaldo Guiguet Leal	292.956.038-00	Doutorado
DATA DE NASCIMENTO	**SEXO**	**E-MAIL**
02/10/1982	Masculino	lealdag@gmail.com
END RESIDENCIAL	**TELEFONE RESIDENCIAL**	**NACIONALIDADE**
Rua Doutor Quirino - De 1302/1303 Ao Fim - Campinas SP	19 - 37227920	Brasileiro
FAX		
INSTITUIÇÃO PROPONENTE		
UFPR - Universidade Federal do Paraná (Rua XV de Novembro, 1299 Curitiba)		
ÁREA DE ATUAÇÃO DO PROPONENTE		
- Ciências Biológicas/Protozoologia de Parasitos - Ciências Biológicas/Parasitologia Ambiental - Ciências Biológicas/Parasitologia clínica - Ciências Biológicas/Helmintologia de Parasitos		

INSTITUIÇÕES - PROJETO

FUNÇÃO	NOME
Colaboradora	UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas
Colaboradora	IAP - Instituto Ambiental do Paraná
Colaboradora	UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Executora/Sede	UFPR - Universidade Federal do Paraná