

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA RODRIGUES

DETECÇÃO DE CISTOS DE *GIARDIA* E OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* EM
BIOMAS MARINHOS E DE ÁGUA DOCE: UM ESTUDO DE MONITORAMENTO DE
DOIS ANOS COMO INSTRUMENTO PARA ELABORAÇÃO DE PROPOSTA DE
LEGISLAÇÃO ESTADUAL DE BALNEABILIDADE NO PARANÁ.

CURITIBA

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA RODRIGUES

DETECÇÃO DE CISTOS DE *GIARDIA* E OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* EM
BIOMAS MARINHOS E DE ÁGUA DOCE: UM ESTUDO DE MONITORAMENTO DE
DOIS ANOS COMO INSTRUMENTO PARA ELABORAÇÃO DE PROPOSTA DE
LEGISLAÇÃO ESTADUAL DE BALNEABILIDADE NO PARANÁ.

Dissertação apresentada como requisito final à
obtenção do título de Mestre, pelo Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia Parasitologia e
Patologia, Setor de Patologia da Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal

Co-orientadora: Prof. Dra. Juliane Araújo Greinert
Goulart.

CURITIBA

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Rodrigues, Amanda, 1993-

Detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em biomas marinhos e de água doce: um estudo de monitoramento de dois anos como instrumento para elaboração de proposta de legislação estadual de balneabilidade no Paraná. / Amanda Rodrigues. – Curitiba, 2020.
126 f. : il.

Orientador: Diego Averaldo Guiguet Leal.

Coorientadora: Juliane Araújo Greinert Goulart.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. *Cryptosporidium*. 2. *Giardíase*. 3. Monitoramento. 4. Praias. 5. Biomas. I. Título. II. Leal, Diego Averaldo Guiguet. III. Goulart, Juliane Araújo Greinert. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20.ed.) 574.5

FOLHA/TERMO DE APROVAÇÃO

AMANDA RODRIGUES

Detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em biomas marinhos e de água doce: um estudo de monitoramento de dois anos como instrumento para elaboração de proposta de legislação estadual de balneabilidade no Paraná.

Dissertação aprovada como requisito final à obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal – UFPR

Dra. Doris Sobral Marques Souza – UFSC

Profa. Dra. Karin Silva Caumo – UFSC

Profa. Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro - UFPR

Curitiba, 20 de Agosto de 2020.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **AMANDA RODRIGUES** intitulada: **Detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em biomas marinhos e de água doce: um estudo de monitoramento de dois anos como instrumento para elaboração de proposta de legislação estadual de balneabilidade no Paraná**, sob orientação do Prof. Dr. DIEGO AVERALDO GUIGUET LEAL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Agosto de 2020.

Assinatura Eletrônica
21/08/2020 17:19:32.0
DIEGO AVERALDO GUIGUET LEAL
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
24/08/2020 11:48:35.0
DORIS SOBRAL MARQUES SOUZA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
21/08/2020 15:46:47.0
KARIN SILVA CAUMO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
21/08/2020 16:00:28.0
MAGDA CLARA VIEIRA DA COSTA RIBEIRO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

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 para 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, Bárbara, Luiza, Maíra, Paloma, Rafael, Roberta 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.

Ao meu orientador Professor Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal por me guiar durante o Mestrado.

Ao Prof Dr. Andrey Andrade, por dividir sabedorias que foram pertinentes ao meu estudo, e a minha co-orientadora Profa Dra Juliane Araújo Greinert Goulart que me ajudou muito em diversos momentos.

Ao Instituto Ambiental do Paraná, ao Gustavo e a professora Paula (FURB) por auxiliar nas coletas e nas análises que foram necessárias para a minha pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Às agências de fomento – Fundação Araucária - CP 01/2016 - Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde: Gestão Compartilhada em Saúde - (Convênio 50 / 2017) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Universal - MCTI / CNPq nº 01/2016), processo 409636/2016-9 pelo financiamento do projeto – “Monitoramento ambiental de parasitos no litoral do Paraná como instrumento para elaboração de proposta de legislação estadual de balneabilidade”.

RESUMO

A giardiose e criptosporidiose são as protozooses intestinais de veiculação hídrica mais relevantes no âmbito mundial. Ambos os protozoários são frequentemente associados como agentes etiológicos de diarreia em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Atualmente, o contato de recreação primário (imersão total do corpo ou ingestão acidental de água) é considerado uma importante via de transmissão de ambos os protozoários. Contudo, os dados acerca da epidemiologia ambiental de protozoários em áreas costeiras brasileiras ainda são limitados e, a caracterização molecular de protozoários nestes ambientes é ainda mais escassa. Os objetivos deste estudo foram: i) realizar o monitoramento ambiental de protozoários patogênicos e indicadores bacteriológicos de contaminação fecal em praias do litoral do Paraná por um período de dois anos; ii) analisar separadamente a água do mar e a água de corpos hídricos dulcícolas que afluem para estes locais quanto a contaminação por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.; iii) verificar a qualidade sanitária de ambos os biomas aquáticos mediante determinação da concentração de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. e iv) analisar e fornecer dados microbiológicos e parasitológicos ao órgão ambiental competente como subsídio para proposição de legislação estadual de balneabilidade. Foram coletadas 144 amostras de água (10L / amostra) mensalmente, de janeiro de 2017 a dezembro de 2018 (n = 24 meses) das praias de Guaratuba, Caiobá e Matinhos (72 amostras de água do mar e 72 amostras de corpos hídricos) para a pesquisa de protozoários patogênicos. As amostras hídricas foram analisadas pela técnica de filtração em membranas com pequenas modificações propostas pelo método 1623.1 (*US Environmental Protection Agency*). A etapa de eluição das membranas foi realizada mediante raspagem e lavagem com Tween 80 (0,1%) e centrifugadas a 1500 x g / 15 min para obter o sedimento. Aliquotas de 10 µL de cada sedimento foram utilizadas para confecção das lâminas e a visualização dos protozoários foi realizada por reação de imunofluorescência direta (RID), utilizando anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*. A confirmação da morfologia dos protozoários foi realizada por microscopia de contraste de interferência e pela incorporação de DAPI ao material nuclear dos protozoários. Todas as amostras positivas por RID foram submetidas à extração de DNA para realização de PCR. Um fragmento de 530 pb do gene triose fosfato isomerase (*tpi*) foi amplificado por *nested*-PCR para *Giardia duodenalis*, assim como o gene *18S rRNA* utilizado como marcador molecular para *Cryptosporidium* spp, sendo os produtos amplificados submetidos ao sequenciamento. A concentração de indicadores fecais foi enumerada por técnicas microbiológicas convencionais e estimativa do número mais provável (NMP / 100 mL). A ocorrência de ambos os protozoários foi detectada em todas as praias durante o período de dois anos. Pelo menos um protozoário foi detectado em 58,3% (n = 14) meses de amostragem. A praia de Guaratuba apresentou os maiores índices de contaminação por protozoários (n=9) amostras positivas em corpos hídricos e mar, seguida de Caiobá (n=8) e Matinhos (n=7). Do total de amostras positivas, cistos de *Giardia* spp. foram identificados em 15 (62,5%), *Cryptosporidium* spp. em sete (29,2%) e ambos os protozoários em duas amostras (8,2%). A contaminação por *Giardia duodenalis* foi confirmada em duas praias, assim como a presença de *Cryptosporidium*, detectado pela primeira vez mediante ensaios de biologia molecular em uma área costeira do Brasil. O monitoramento microbiológico evidenciou importante impacto de contaminação fecal em todas as praias, especialmente nos corpos hídricos que afluem para o mar, sendo observada expressiva contaminação no primeiro ano e, redução nas taxas de contaminação no segundo ano de monitoramento. Este é o primeiro relato da ocorrência destes protozoários em áreas recreacionais do estado do Paraná e o primeiro estudo conduzido em diferentes biomas (dulcícolas, salobros e salinos) que compõe áreas costeiras a monitorar conjuntamente a qualidade parasitológica e microbiológica por um extenso período de tempo. Os resultados poderão ser utilizados para nortear estratégias de gerenciamento de áreas costeiras, assim como para a criação de uma legislação estadual de balneabilidade visando à melhoria da qualidade sanitária de praias e a proteção da saúde pública.

Palavras Chaves: Balneabilidade; *Cryptosporidium*; *Giardia*; Monitoramento; Parasitologia Ambiental; Praias.

ABSTRACT

Giardiasis and cryptosporidiosis are the most relevant waterborne intestinal protozoosis worldwide. Both parasites are frequently associated as the aetiological agents of diarrhea in developing and developed countries. Currently, primary contact recreational (total body immersion or accidental ingestion of water) is clearly an important route of transmission of both protozoa. However, data on environmental epidemiology of protozoa in Brazilian coastal areas are still limited and molecular characterization is even scarcer. The main goals of this study were: i) to perform the environmental monitoring of pathogenic protozoa and bacteriological indicators of fecal contamination on beaches of Paraná coast for a period of two years; to analyze separately seawater and freshwater bodies of water which flows to these sites for contamination by *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts; iii) to verify the sanitary quality of both aquatic biomes by enumeration of concentration of *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp.; and iv) to analyze and provide microbiological and parasitological data to the environment responsible agency as a subsidy for proposing a state balneability legislation. A total of 144 water samples (10 L / sample) were harvested monthly through January 2017 to December 2018 (n = 24 months) from Guaratuba, Caiobá and Matinhos beaches (72 samples of seawater and 72 of water bodies) to search for pathogenic protozoa. Water samples were processed by the membrane filtration technique with minor modifications proposed by 1623.1 method (US Environmental Protection Agency). The membrane elution step was performed by scraping and washing it with Tween 80 (0,1%) being the resulting liquid centrifuged (1500 x g / 15 min) to obtain the pellet. Aliquots of 10 µL of each sediment were used to make the slides and the visualization of the protozoa was performed by direct immunofluorescence assay (IFA) using Anti-*Cryptosporidium* and Anti-*Giardia* monoclonal antibodies. Confirmation of protozoa morphology was performed using differential interference contrast microscopy and by the incorporation of vital dye DAPI to protozoa nuclear material. All samples that were confirmed as positive on IFA were submitted do DNA extraction for PCR analysis. A fragment of 530 bp of the triose phosphate isomerase gene (*tpi*) was amplified by nested-PCR for *Giardia duodenalis*, as well as *18S rRNA* gene as molecular marker for *Cryptosporidium* spp., being the amplified products submitted to sequencing reactions. The concentrations of faecal indicators were enumerated by conventional microbiological techniques and estimative of most probable number (MPN / 100mL). The occurrence of both protozoa were detected on all beaches during the two year monitoring period. At least one protozoa were detected in 58.3% (n = 14) months of sampling. Guaratuba was the most contaminated beach with the highest record of parasites on water bodies or seawater sites (n = 9 positive samples), followed by Caiobá (n = 8) and Matinhos (n = 7). From the total of positive samples, *Giardia* spp. was detected in 15 (62.5%), *Cryptosporidium* spp. in 7 (29.2%) and both parasites appeared in 2 (8.3%) samples. The contamination by *Giardia duodenalis* was confirmed on two beaches, as well as the presence of *Cryptosporidium*, detected for the first time through molecular assays in a coastal area of Brazil. Microbiological monitoring showed an important impact of fecal contamination in all beaches, especially on water bodies that flow into the sea, with significant contamination being observed in the first year and a reduction in contamination rates in the second year of monitoring. This is the first report of the occurrence of pathogenic protozoa on recreational areas of Paraná state, and the first study conducted in different biomes (freshwater, brackish and saline) that composes coastal areas to monitor together parasitological and microbiological quality for an extended period of time. The results may be used to guide coastal area management strategies, and also contribute to elaborate state balneability legislation, aiming the improvement of the sanitary quality of beaches and to safeguard public health.

Key-words: Balneability; Beaches; *Cryptosporidium*; Environmental Parasitology; *Giardia*; Monitoring.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Número máximo permitido de indicadores bacteriológicos que regem a balneabilidade de áreas costeiras e estuarinas no Brasil e outras localidades do mundo de acordo com diferentes órgãos ambientais e de saúde pública.....	8
Tabela 2 Indicadores de acesso, coleta e tratamento de esgoto no mundo e no Brasil.....	12
Tabela 3 Registros de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em águas marinhas e estuarinas do mundo.....	15
Tabela 4 <i>Giardia</i> spp. e especificidade parasitária.....	21
Tabela 5 <i>Cryptosporidium</i> e potencial infectante para humanos.....	30
Tabela 6 Ocorrência e concentração de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> por litro por mês em que se detectou positividade por RID em corpos hídricos que afluem para o mar e em água marinha das três principais praias do litoral paranaense durante 24 meses de monitoramento.....	56
Tabela 7 Contaminação por bactérias indicadoras de contaminação fecal expressos em NMP / 100 mL: valores mínimos, máximos e médias para cada ponto referente ao ano de 2017 e 2018.....	69
Tabela 8 Concentração de indicadores e valores de parâmetros físico-químicos nos meses em que se detectou a presença de protozoários.....	71
Tabela 9 Médias obtidas de diferentes parâmetros físico-químicos monitorados mensalmente nos ambientes aquáticos e marinhos das principais praias do litoral do Paraná durante 24 meses.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Porcentagem de turistas internacionais e destinos visitados no Brasil.....	4
Figura 2 Fontes diversas de contaminação fecal do ambiente marinho.....	11
Figura 3 Rotas de transmissão de giardiose e criptosporidiose por contato direto e indireto.....	23
Figura 4 Pontos de coleta de água do rio e água do mar das três praias monitoradas por um período de dois anos no litoral do Paraná.....	38
Figura 5 Procedimento de coleta de amostras hídricas de praias do litoral do Paraná.....	39
Figura 6 Prevalência de de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em corpos hídricos dulcícolas que afluem para o mar durante 24 meses de monitoramento.....	61
Figura 7 Prevalência de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em água do mar durante 24 meses de monitoramento.....	63
Figura 8 Porcentagem de contaminação por ambos os protozoários patogênicos em três praias do Paraná no primeiro e segundo ano e, na somatória dos 24 meses de análise.....	65
Figura 9 Eletroforese em gel de agarose a 1, 5% corado com GelRed® (Biotium). Resultados obtidos após a realização da <i>nPCR</i> para detecção do fragmento de 611pb de <i>Cryptosporidium</i>	66
Figura 10 Comparação entre as médias obtidas de parâmetros físico-químicos de ambientes dulcícolas e salinos das principais praias paranaenses em 24 meses de monitoramento. A: ano de 2017 e B: ano de 2018.....	73

LISTA DE SIGLAS

CDC–Centers for Disease Control and Prevention

CONAMA–Conselho Nacional do Meio Ambiente

DAPI- 4,6-diamidino-2-phenylindole

FISH- Fluorescence in Situ Hybridization

IMS–Immunomagnetic Separation

IAP- Instituto Ambiental do Paraná

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFA- Immunofluorescence Assay

NMP- Número mais provável

PCR– Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

RID– Reação de imunofluorescência direta

USEPA– United States Environmental Protection Agenc

WHO– World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Áreas costeiras e turismo no Brasil.....	3
2.1.1 Costa Paranaense.....	5
2.2 Legislações que regem a balneabilidade no Brasil e no mundo.....	7
2.3 Impactos antropogênicos em áreas costeiras.....	10
2.3.1 Protozoários patogênicos no ambiente marinho.....	13
2.4 <i>Giardia</i> spp. e giardiose.....	20
2.5 <i>Cryptosporidium</i> spp. e criptosporidiose.....	26
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Caracterização do local de estudo e pontos de coleta das amostras de água.....	38
4.1.2 Procedimentos de coleta das amostras hídricas.....	39
4.2 Detecção de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. em amostras hídricas.....	40
4.2.1 Filtração das amostras de água.....	40
4.2.2 Visualização dos parasitos por reação de imunofluorescência direta e critérios de positividade.....	41
4.2.3 Cálculo do número de oocistos e/ou cistos encontrados por litro na água do rio e na água marinha em situação natural de contaminação.....	43
4.2.4 Caracterização molecular de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	45
4.2.4.1 Extração de DNA genômico.....	45
4.2.4.2 Amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase dupla (<i>nested</i> PCR).....	45
4.2.4.3 Eletroforese em gel de agarose.....	48
4.2.4.4 Caracterização molecular pela técnica de sequenciamento direto.....	48
4.2.4.5 Caracterização molecular de cistos de <i>Giardia</i> spp.....	49
4.3 Monitoramento microbiológico.....	50
4.4 Monitoramento de parâmetros físico-químicos.....	53
4.5 Análise estatística.....	53
5. RESULTADOS.....	53

5.1 Detecção de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. em corpos hídricos dulcícolas e água do mar nas praias de Guaratuba, Caiobá e Matinhos.....	53
5.2 Caracterização molecular	66
5.2.1 <i>Cryptosporidium</i> spp.	66
5.2.2 <i>Giardia</i> spp.....	67
5.3 Resultados Microbiológicos	68
5.3.1 Correlação entre bactérias e protozoários parasitos.....	70
5.4 Monitoramento de parâmetros físico-químicos.....	72
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÕES.....	102
8. REFERÊNCIAS.....	104
9. ANEXOS.....	126

1. INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas (ONU) desenvolveu a agenda 2030 que versa sobre os novos objetivos para o desenvolvimento sustentável mundial. Entre as 17 novas metas propostas, o item 14 (vida na água) determina sobre a conservação do patrimônio marinho ambiental e a diminuição dos efeitos antrópicos nestes ambientes. Aproximadamente US \$ 3 trilhões da economia global ou 5% do Produto Interno Bruto do planeta é proveniente de atividades relacionadas ao oceano e, mais de três bilhões de pessoas dependem da biodiversidade marinha para sua subsistência (United Nations, 2015).

Além da inegável importância dos ecossistemas costeiros como fonte de alimento e de renda para seus habitantes autóctones (Souza et al., 2012; Leal et al., 2013), os oceanos absorvem parte do dióxido de carbono produzido pelos seres humanos, auxiliando na minimização dos impactos do aquecimento global (United Nations, 2015).

Ademais, a utilização de ambientes estuarinos e costeiros pelo ser humano para o lazer e a natação é uma das atividades recreacionais mais populares em todo o mundo. Apesar 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).

Corpos hídricos utilizados pelo ser humano, principalmente fontes de água doce como rios, riachos e lagos, estão continuamente expostos à contaminação por resíduos resultantes de atividades industriais e liberação de efluentes *in natura* ou tratados (Dowbor e Tagnin, 2005). O desaguamento destes corpos hídricos, naturalmente implicará em contaminação das áreas costeiras utilizadas para recreação humana, sendo

responsável pela introdução de uma ampla variedade de enteropatógenos humanos que colocam em perigo a saúde dos banhistas (Fayer et al., 2004; Wyn-Jones et al., 2011; Koloren et al., 2013). Dentre estes, os protozoários intestinais patogênicos emergiram como uma preocupação há mais de 25 anos, sendo *Giardia duodenalis* e espécies de *Cryptosporidium*, os principais agentes responsáveis por surtos de gastroenterite mediante veiculação hídrica em escala mundial (Baldursson and Karanis, 2011; Efstratiou et al., 2017).

Em anos recentes, muitos avanços acerca da rastreabilidade das fontes de contaminação fecal por protozoários patogênicos em ambientes marinhos e outros ambientes aquáticos foi possível, devido ao advento da biologia molecular. O emprego de tais ferramentas é importante para a proposição de estratégias de mitigação da contaminação e, ações para o entendimento e controle de surtos de veiculação hídrica (Thompson e Ash, 2019). Entretanto, dados acerca da epidemiologia ambiental e molecular de *Giardia duodenalis* e espécies de *Cryptosporidium* em ambientes costeiros são incipientes ou inexistentes na maior parte das regiões costeiras do Brasil. A detecção de ambos os parasitos no litoral brasileiro concentram-se até o momento, nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Santa Catarina (Leal et al., 2008; Souza et al., 2012; Couto et al., 2016; Coelho et al., 2017; Leal et al., 2018a; Pinto et al., 2020).

Desta forma, a ampliação dos estudos que visam investigar a contaminação por protozoários patogênicos em praias e estuários do Brasil é relevante, visto que atuam como uma ferramenta complementar ao monitoramento de bactérias indicadoras de contaminação fecal para classificação da balneabilidade destas áreas recreacionais. Além disso, estudos de epidemiologia ambiental podem nortear o desenvolvimento de programas de gerenciamento de risco em áreas costeiras, mediante preconização da pesquisa destes organismos patogênicos pela criação ou revisão da legislação vigente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ÁREAS COSTEIRAS E TURISMO NO BRASIL.

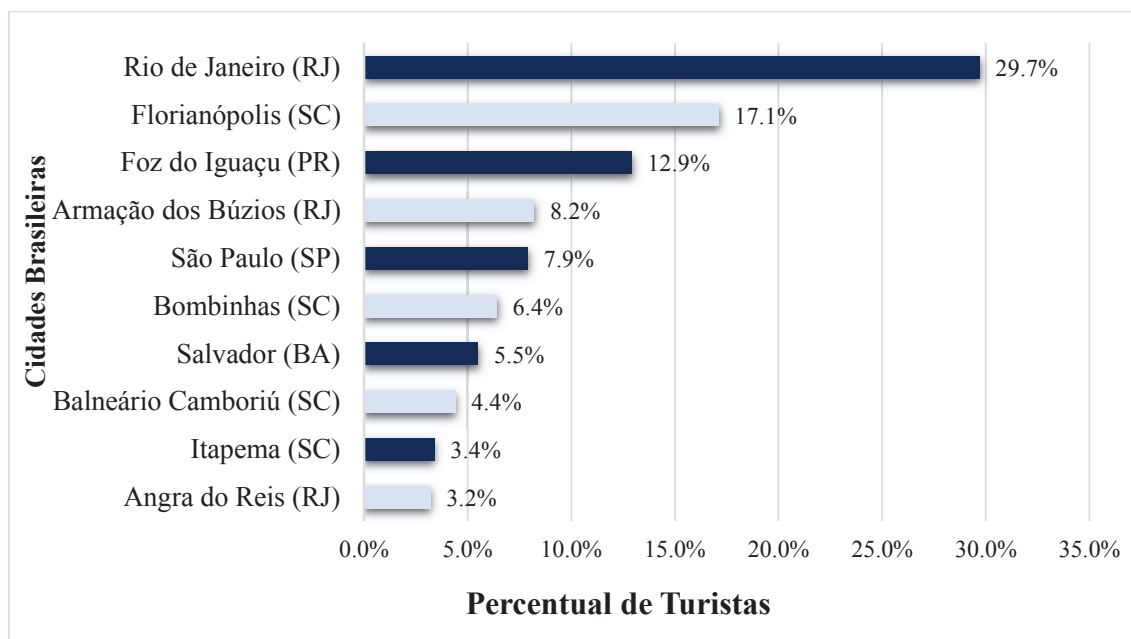
No Brasil, mais de 42 milhões de indivíduos residem em áreas costeiras, totalizando 26,58% da população de acordo com o último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011). Dentre os 26 estados brasileiros, 17 possuem costa litorânea. O ambiente costeiro é constituído de ecossistemas muito diversificados: cordões litorâneos, dunas, manguezais, recifes de corais e algas, restingas, praias, além de recifes de arenitos. Estes ambientes foram determinantes e influenciaram a cultura e história de cada uma das diferentes populações costeiras brasileiras. Estas áreas estão sujeitas à deterioração e maiores impactos ambientais por concentrar grande contingente da população brasileira e recebimento de grande aporte de turistas (Albuquerque, 2016).

O Brasil dispõe de 8.500 km de costa sendo o turismo um grande impulsionador da economia e fonte de renda para os habitantes desses locais (Pereira et. al, 2016). As paisagens litorâneas representam o grande atrativo turístico do país, movimentando milhões de indivíduos anualmente. O país possui grande quantidade de praias - mais de duas mil - atraindo cerca de 1,7 milhão de visitantes estrangeiros e aproximadamente 27 milhões de brasileiros ao ano (Ministério do Turismo, 2016). Entre os destinos turísticos brasileiros mais visitados no período compreendido de 2014 a 2018 estão: Rio de Janeiro em primeiro lugar, Florianópolis em segundo e Foz do Iguaçu na terceira posição (Ministério do Turismo, 2018). Dentre os três destinos turísticos mais visitados no país por estrangeiros, dois deles localizam-se em áreas costeiras (Figura 1).

Em questionários de avaliação de motivação da viagem de cada turista, menciona-se como principal razão o turismo de sol e praias, sendo que oito dos dez principais destinos buscados no Brasil no ano de 2018 concentram-se em áreas costeiras

(Figura 1). Em adição, observa-se que dentre as principais cidades visitadas por estes turistas, 50% estão localizadas na região sul do País, sendo 80% destas, cidades litorâneas (Figura 1).

Figura 1: Porcentagem de turistas internacionais e destinos visitados no Brasil. Adaptado de (Brasil, 2018).



Durante o período que antecedeu os Jogos Olímpicos do Rio de Janeiro (2016) diversas especulações emergiram por atletas e profissionais de saúde coletiva e saúde pública, devido à qualidade sanitária deficitária de águas marinhas ou das águas da Baía de Guanabara. As preocupações diziam respeito à realização de modalidades esportivas como Canoagem, Natação (Travessias), Remo, Surfe, Triatlo e Vela e a segurança dos atletas (Fiamoncini et. al, 2016). Desta forma, a capacidade do Brasil de sediar tal evento foi questionada (Bessel et al., 2016).

De acordo com a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Continuada, conduzida pelo IBGE (2017) em conjunto com o relatório de Benefícios Econômicos e Sociais da Expansão do Saneamento no Brasil elaborado pelo Instituto Trata Brasil

(2018), demonstrou-se relação direta entre o acesso ao saneamento básico e o desenvolvimento do turismo no país. Além disso, os estudos revelaram que na média nacional, os indivíduos que moram em áreas com acesso a saneamento básico apresentavam maiores chances de ter uma ocupação em atividades do turismo (alojamento e alimentação, atividades recreativas, culturais e desportivas), com maior aporte de entrada de turistas nacionais e estrangeiros.

Deste modo, a escassez de saneamento ambiental é apontada no mundo todo como causa importante de aquisição de enfermidades como gastroenterite, doenças oftálmicas ou dermatológicas adquiridas pelo contato com águas costeiras contaminadas. Essas são inclusive, as causas mais frequentemente reportadas por turistas estrangeiros que necessitaram buscar assistência médica ao retornar aos seus países de origem, após viagens internacionais (Pearce, 1981; Wilks et al., 1995; Gautret et al., 2009; Wilson et al., 2014).

2.1.1 COSTA PARANAENSE

A região sul do Brasil possui ao todo 1.258 km de costa. O estado do Paraná apresenta uma das menores costas dentre os estados litorâneos do Brasil - cerca de 105 km de extensão linear de norte a sul. No entanto, considerando-se áreas estuarinas, ilhas e demais reentrâncias, a costa paranaense expande para 1.675 km (Angulo, 2004).

De acordo com o Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social, o clima da região é caracterizado por uma precipitação irregular - maiores índices na planície litorânea - sendo esta diminuída gradativamente até chegar à Serra do Mar. Os maiores registros anuais correspondem a 2.500 mm. Além disso, apresenta temperatura

média de 20,8 a 22 °C nas latitudes meridionais e setentrionais, respectivamente. As máximas registradas no verão correspondem a 29,6 °C, período também de muitas chuvas.

Ao todo, o estado do Paraná possui sete municípios litorâneos que são subdivididos em grupos econômico-culturais: os portuários (Paranaguá e Antonina) os rurais (Morretes e Guaraqueçaba) e os praianos-turísticos (Matinhos, Guaratuba e Pontal do Paraná). Esses sete municípios representam apenas 3% do território do estado, com proporções muito distintas entre si, variando de 111,5 km² - Matinhos, Pontal do Paraná - 216,2 km² e Guaratuba - 1.326,8 km² (Estades, 2003). Guaratuba e Matinhos são as cidades mais populosas do litoral do Paraná com população estimada de 37.067 e 34.720, respectivamente (IBGE, 2019). As cidades litorâneas se desenvolveram majoritariamente pelo comércio local, turismo e grande expressividade da pesca artesanal, sendo esta última, enfraquecida ao longo dos anos (Lopes, 2017).

A alta temporada - estação de verão - é comumente marcada por um maior fluxo de turistas para áreas costeiras no Brasil, inclusive no estado do Paraná. O maior contingente de visitantes ao estado advém de turistas nacionais (Secretaria do Desenvolvimento sustentável e do Turismo do Paraná, 2019). Paralelamente ao aumento populacional durante a alta temporada, observa-se importante incremento do despejo de lixo nas praias. Em Guaratuba, mais de 200 toneladas de dejetos foram recolhidas nas festividades de final do ano de 2019 (Correio do Litoral, 2019) o que aliado ao saneamento precário amplia as fontes de contaminação e assim, contribui para o aparecimento de doenças de etiologias diversas.

2.2 LEGISLAÇÕES QUE REGEM A BALNEABILIDADE NO BRASIL E NO MUNDO

O monitoramento contínuo de áreas costeiras visa a segurança da população de banhistas e nadadores. No Brasil, e em diversos países e organizações do mundo, a aferição da balneabilidade – qualidade das águas, bem como registros de inferência se a mesma apresenta-se própria ou imprópria para banho - é feita mediante a enumeração de bactérias indicadoras de contaminação fecal (Portugal, 1998; Brasil, 2000; International Maritime Organization, 2002; WHO, 2003; USEPA, 2003; European Union, 2006).

Os indicadores microbiológicos de contaminação fecal fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal de mamíferos e aves (Harwood et al., 2014; Nguyen et al., 2018) e, são comumente detectados em águas recreacionais não tratadas. Dentre esses, os mais utilizados para tal monitoramento são os coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* ou enterococos sendo estes, adotados em todo o mundo por mais de um século (AWWA, 1990; Brasil, 2000; European Union, 2006). Entretanto, os parâmetros, a concentração e limites máximos permitidos de bactérias indicadoras variam entre os países e organizações (Tabela 1).

No Brasil, a resolução nº 274 de 2.000 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) define os critérios de balneabilidade para águas marinhas e salobras e, estabelece que estas devam ser consideradas impróprias para fins recreacionais quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, no trecho avaliado for verificado valores acima dos padrões máximos estipulados em número mais provável (NMP) em 100 mL: - 1.000 coliformes termotolerantes / 100 mL ou 800 *Escherichia coli* / 100 mL ou 100 enterococos / 100 mL.

Tabela 1: Número máximo permitido de indicadores que regem a balneabilidade de áreas costeiras e estuarinas no Brasil e outras localidades do mundo de acordo com órgãos ambientais e de saúde pública.

Organização / país	<i>E. coli</i>	Enterococos	Coliformes fecais ⁺ / Coliformes termotolerantes ⁺⁺
WHO *	-	≤ 40 até > 500 / 100 mL	-
IMO	-	35 - 100 / 100 mL	-
USEPA / EUA **	-	35 / 100 mL	-
EU ***	250 até 500 / 100 mL	100 até 200 / 100 mL	-
MA / Portugal ⁺	-	-	100 – 2000 / 100 mL
CONAMA / Brasil ⁺⁺	200 até 800 / 100 mL	25 até 100 / 100 mL	250 até 1.000 / 100 mL

Legenda:

*WHO – World Health Organization; - os valores são expressos acerca da enumeração de enterococos por número mais provável em 100 mL em um percentil de 95% das amostras, onde a classificação da qualidade das áreas recreacionais varia da seguinte forma: A = ≤ 40 (muito boa); B = 41-200 (boa); C = 201-500 (satisfatória); D = > 500 NMP / 100 mL (insatisfatória).

IMO - International Maritime Organization- número estimado de enterococos em um percentil de 95% das amostras, por número mais provável em 100 mL, sendo classificado como: satisfatória = 35 / 100 mL e insatisfatória = 100 NMP / 100 mL

**USEPA / EUA – United States Environmental Protection Agency - Estados Unidos da América; - média geométrica da concentração de enterococos não deve ultrapassar 35 NMP / 100 mL sendo que devem ser analisadas no mínimo 5 amostras.

***EU – European Union; - Enumeração de *E. coli* por unidade formadora de colônia (UFC) por 100 mL em um percentil de 95% das amostras, onde a classificação da qualidade da água varia da seguinte forma: excelente = 250 / 100 mL; boa = 500 / 100 mL. Enterococos (UFC): excelente = 100 / 100 mL; boa = 200 / 100 mL. Classificação da qualidade da água como satisfatória em um percentil de 90% das amostras para *E. coli* = 500 / 100 mL e enterococos = 185 UFC / 100 mL.

⁺MA / Portugal – Ministério do Ambiente - Enumeração de coliformes fecais em áreas recreacionais marinhas com periodicidade mínima quinzenal sendo o valor máximo recomendado de 100 e o valor máximo admissível de 2000 NMP/ 100 mL.

⁺⁺CONAMA / Brasil – Conselho Nacional do Meio Ambiente - as águas marinhas são classificadas como próprias, seguindo o escalonamento mundial acerca da qualidade quando em um percentil de 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores forem obtidos os seguintes valores: Excelente = no máximo 250 coliformes fecais (termotolerantes) ou 200 *Escherichia coli* ou 25 enterococos por 100 mL; muito boa = valores até 500 coliformes fecais (termotolerantes), 400 *Escherichia coli* ou 50 enterococos por 100 mL e satisfatória = valores no máximo de 1.000 coliformes fecais ou 800 *Escherichia coli* ou 100 enterococos por 100 mL.

Escherichia coli foi descrita em 1885 por Theodor Escherich - um médico pediatra alemão – em seus estudos acerca da microbiota intestinal de bebês, recém-nascidos e crianças. Entretanto, seu potencial patogênico foi descrito primariamente em infecções extraintestinais (Rowe et al., 1983). Pertence ao grupo de bactérias gram-negativas da família Enterobacteriaceae, sendo estas encontradas amplamente no trato gastrointestinal inferior de animais homeotérmicos (Silva et al., 2015). Estes microrganismos podem se desenvolver em temperaturas que variam de 7 a 46°C, porém, apresenta melhor desenvolvimento (temperatura ótima) entre 35 e 40° C e, pH ótimo de 4,5 (Bell, 1998).

Dentre as cepas patogênicas, observa-se uma ampla variedade de manifestações clínicas, relacionadas à adesão a mucosa intestinal e a produção e liberação de enterotoxinas, que desencadeiam especialmente diarreia e desidratação (Nakazato, 2004; Silva et al., 2015), sendo a cepa mais patogênica ao ser humano a O157:H7 (OMS, 2003).

Enterococos se inclui no grupo de bactérias gram-positivas, residentes do trato gastrointestinal especialmente de mamíferos e, apresentam virulência relativamente baixa (Paradella et al. 2007). São bactérias capazes de crescer em condições salinas de até 6,5% e por esta razão, são considerados os melhores indicadores de qualidade de água salinas ou salobras em nível mundial. (Brasil, 2000; USEPA, 2003; WHO, 2003; European Union, 2006). Em adição, em alguns países e para algumas organizações, são os únicos indicadores aferidos em águas com teores diversos de salinidade (Tabela 1). Além disso, exibem alta tolerância e crescimento frente a fatores abióticos como diferença de temperaturas de 10 a 45°C e, pH elevados de até 9,6 (Brasil, 2000; Paradella et al., 2007).

Ressalte-se que importantes patógenos causadores de gastroenterite, apresentam distribuição ubíqua e marcada resistência ambiental, tal como os protozoários patogênicos *Cryptosporidium* e *Giardia* e vírus entéricos humanos, não contemplados pela legislação vigente que regulamenta a balneabilidade do extenso litoral brasileiro (Brasil, 2000).

2.3 IMPACTOS ANTROPOGÊNICOS EM ÁREAS COSTEIRAS

A introdução de resíduos domésticos e industriais no ambiente representa um problema ecotoxicológico crescente no mundo, principalmente para a zona costeira, que os recebe de forma frequente (Cearreta et al., 2000). O ambiente marinho também é destino final de muitos outros contaminantes - metais tóxicos, pesticidas e compostos orgânicos e inorgânicos – que se dispersam e bioacumulam entre a água, sedimentos e organismos (Gomez-Parra et al., 2000; Taniguchi, 2001; Souza et al., 2012).

O Brasil vivenciou um enorme impacto em suas águas oceânicas quando no dia 29 de Julho de 2019 foi detectada uma mancha de óleo a 733,2 quilômetros da costa brasileira, precisamente na região Nordeste do país (Borges, 2019). De acordo com o mesmo autor, ao entrar em contato com a costa, mais de 3,6 mil quilômetros do litoral foram impactados pelo óleo, oriundo de um navio, atingindo 942 localidades dentre um total de 129 municípios na faixa que compreende a região Nordeste até o Sudeste do país. Segundo a Marinha e o IBAMA (2019) foram coletados ao todo cinco mil toneladas de petróleo cru nas praias atingidas (Borges, 2019).

O Brasil tem registrado diversos desastres ambientais nos últimos anos. Além do derramamento de petróleo, recentemente o país vivenciou dois desastres ecológicos devido ao rompimento de duas barragens um em 2015 em Mariana e outro em 2019 em

Brumadinho, ambos no estado de Minas Gerais (Passarinho, 2019; Ribeiro & Cruz, 2019). Esses eventos são preocupantes para a saúde pública e ambiental, pois geram riscos de médio a longo prazo para a população local (Wanderley et al., 2016; Ribeiro & Cruz, 2019). Em adição, a contaminação de rios que compõe importantes bacias hidrográficas, ampliam os impactos ambientais para áreas costeiras e estuarinas devido ao desaguamento de águas dulcícolas contaminadas nestes locais.

Dentre as várias fontes de contaminação do ambiente marinho, o despejo de esgoto bruto ou tratado diretamente no mar ou advindo de rios e corpos hídricos é considerado na atualidade a principal fonte de alteração da qualidade e balneabilidade de áreas costeiras em todo o mundo (Bon, 2013; Lim et al., 2017). Weiskerger e colaboradores (2019) ilustraram em revisão recente as várias vias de contaminação fecal do ambiente costeiro - associadas à presença de animais domésticos e silvestres, o escoamento urbano e às mudanças climáticas – com destaque também, para a contaminação contínua que o mar recebe da areia devido à densidade populacional que influencia diretamente o aumento de microrganismos patogênicos na zona costeira (Figura 2).

Figura 2: Fontes diversas de contaminação fecal do ambiente marinho.



(Fonte: Weiskerger et al., 2019).

Levantamentos percentuais recentes revelaram que 2,1 bilhões de pessoas no mundo não contam com acesso ao saneamento básico (Tabela 2). No Brasil, 54% dos esgotos não recebem nenhum tipo de tratamento e, apenas no ano de 2017, aproximadamente 5.622 piscinas olímpicas de esgoto não tratado foram lançados na natureza no país (Instituto Trata Brasil, 2019).

O Paraná apresenta taxa de tratamento de esgoto de 69,77%, porcentagem esta que posiciona o estado com maior índice de tratamento de esgoto na região sul (Tabela 2). Porém, o saneamento do litoral paranaense é dissonante: de acordo com o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2017), o saneamento das praias paranaenses mostrou-se deficiente em relação a capital do estado – Curitiba.

Tabela 2: Indicadores de acesso, coleta e tratamento de esgoto no mundo e no Brasil.

Nº de indivíduos sem acesso a saneamento básico	Porcentagem de Coleta de esgoto	Porcentagem de Tratamento de esgoto
No mundo		
2,1 bilhões	74%	74%
No Brasil		
100 milhões	52,36%	46%
No sul do Brasil		
15 milhões	43,93%	44,93%
No Paraná		
1,3 milhão	67,96%	69,77%

(Fonte: Trata Brasil, 2019; SNIS, 2018; UNICEF, 2019).

Sendo assim, o saneamento deficiente em áreas costeiras expõe a população local, de turistas e visitantes ao risco de aquisição de uma ampla variedade de doenças (Heaney et al., 2012; Berg et al., 2013).

Os patógenos de veiculação hídrica, associados a atividades recreacionais em áreas costeiras e estuarinas são majoritariamente bactérias, vírus e parasitos. Dentre os parasitos, merecem especial menção os protozoários patogênicos intestinais causadores de gastroenterite *Giardia duodenalis* e espécies de *Cryptosporidium* (Fayer e Lindsay, 2004; Betancourt et al., 2014; Efstratiou et al., 2017; Coelho et al., 2017; Graciaa et al., 2018).

Cryptosporidium spp. e *Giardia duodenalis* vêm ganhando destaque como importantes agentes etiológicos de surtos associados à recreação de contato primário, especialmente em águas tratadas (piscinas e parques aquáticos) (Efstratiou et al., 2017; Gharpure et al. 2019). Entretanto, surtos devidamente documentados associados ao ato de nadar em águas oceânicas por ambos os protozoários nestes ambientes são inexistentes no Brasil e escassos no mundo.

2.3.1 PROTOZOÁRIOS PATOGÊNICOS NO AMBIENTE MARINHO

Os protozoários patogênicos adentram o ambiente marinho especialmente devido ao despejo de esgoto bruto e tratado (Fayer et al., 2004; Castro-Hermida et al., 2008). Outras fontes de introdução apresentam relevância, tais como por despejo de fezes por barcos, fezes de animais, desastres naturais como maremotos ou Tsunamis, escoamento superficial e alagamentos após altos períodos de precipitação (Tabela 3).

De fato, o impacto da contaminação fecal por cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. já foi evidenciado em áreas costeiras (estuários, praias e balneários) de quase todos os continentes do mundo. Contudo, estes dados são inexistentes na maioria dos países que apresentam áreas litorâneas, especialmente na

América Latina e no continente Africano (Karanis et al., 2007; Rosado-García et al., 2017; Coelho et al., 2017; Squire e Ryan 2017) (Tabela 3).

É importante mencionar que estes protozoários apresentam grande longevidade no ambiente marinho e, extrema resistência a fatores abióticos como diferentes concentrações de salinidade e temperatura, sendo capazes de manter sua capacidade infectante inalterada por longos períodos - de alguns meses até mesmo um ano (Fayer et al., 1998; Tamburrini e Pozio, 1999).

Considerando os aspectos de resistência ao ambiente marinho e, a baixa dose infectante necessária para ocasionar infecções em mamíferos (incluindo seres humanos) - 10 cistos e oocistos em média (Rendtorff et al., 1954; Visvesvara et al., 1988) – pode representar um risco de aquisição de ambas as protozooses intestinais mediante contato recreacional em diversas áreas costeiras impactadas (Fayer et al., 2004).

Tabela 3: Registros de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em águas marinhas e estuárias do mundo.

Localização	Metodologia de detecção	Amostragem / Resultados	Concentração de (oo)cistos	Fonte(s) de contaminação suspeita(s)	Referência
Praias de Waikiki, Havai (Estados Unidos).	IFA	29 amostras; <i>Crypto</i> : 14,0 % (4 amostras positivas); <i>Giardia</i> : 21,0 % (6 amostras)	<i>Crypto</i> : 0,01-0,11/L <i>Giardia</i> : 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).	IFA	6 pontos amostrados / 10 ocasiões; <i>Crypto</i> e <i>Giardia</i> detectados em todos os pontos	<i>Crypto</i> e <i>Giardia</i> : 1 (oo) cisto/L	Transbordamento de esgoto; escoamento superficial (associado com altos períodos de precipitação).	Ferguson et al, 1996.
Praias de Hong Kong (China).	IFA	64 amostras; vários pontos de amostragem; <i>Crypto</i> (não pesquisado) <i>Giardia</i> : 31 pontos 48,0 % de positividade.	<i>Giardia</i> : 1-23 cistos/L	Esgoto	Ho e Tam, 1998.
Baia de Sarasota, Flórida (EUA).	IFA	11 pontos analisados (quatro vezes); <i>Crypto</i> : positividade em 3 pontos; <i>Giardia</i> : 1 ponto com amostra positiva.	<i>Crypto</i> : 10-16 oocistos/L <i>Giardia</i> : 16 cistos/L	Esgoto; rompimento de cano de esgoto; banhistas; despejo de fezes por barcos.	Lipp et al, 2001a.
Estuário de Charlotte Harbor, Flórida (Estados Unidos).	IFA	8 pontos amostrados (quatro vezes); <i>Crypto</i> : 2 pontos com 1 amostra positiva; <i>Giardia</i> : 1 ponto com 1	Para ambos os protozoários: 0,047-	Escoamento superficial	Lipp et al, 2001b
					Continua.

Mersin, região mediterrânea do sul da (Turquia).		amostra positiva e outro com 2.	1,77 (oo)cistos/ L		
	Kinyouin modificado	12 pontos amostrados em duas ou quatro ocasiões; <i>Crypto</i> : 1 ponto positivo; <i>Giardia</i> : não analisado	Não reportado	Não reportado	Ceber et al, 2005.
Estuários da costa da Galícia (Espanha).	IMS e IFA	4 regiões estuarinas; 7 pontos amostrados em uma ocasião; <i>Crypto</i> : detectado em 5 pontos; <i>Giardia</i> 6 pontos	<i>Crypto</i> : 1-17 oocistos/L <i>Giardia</i> : 0,4-29,3 cistos/L	Efluente de esgoto; escoamento superficial	Gómez-Couso et al, 2005, 2006a.
Estuário de Oosterschelde (Holanda).	IMS e IFA	2 pontos amostrados (2 vezes); <i>Crypto</i> e <i>Giardia</i> : detectados em 1 ponto em 2 períodos	<i>Crypto</i> : 1-4,9 oocistos/L <i>Giardia</i> : 0,6 cistos/L	Efluente de esgoto; escoamento superficial	Schets et al, 2007
Estuário – confluência com o Rio Sena (França).	IFA	8 amostras; 4 positivas para <i>Giardia</i> e 6 positivas para <i>Crypto</i> .	<i>Crypto</i> : 3-24 oocistos/L <i>Giardia</i> : 2,4-27 cistos/L	Despejo de efluentes brutos e tratados	Touron et al, 2007
Praia de Chesapeake Bay, Maryland (Estados Unidos).	FISH	Amostras coletadas durante onze semanas do verão americano: <i>Dias de semana</i> (n = 33 amostras) <i>Cryptosporidium parvum</i> : 2 amostras positivas <i>Giardia duodenalis</i> : amostras positivas (2) <i>Finais de semana</i> (n = 27 amostras)	<i>Dias de semana</i> <i>C. parvum</i> : 0-7 oocistos/L <i>G. duodenalis</i> : 0-4 cistos/L <i>Finais de semana</i> <i>C. parvum</i> : 2-42	Contingente de banhistas maiores nos finais de semana; Ressuspensão do sedimento da praia; Contaminação fecal	Graczyk et al, 2007.

				oocistos/L	
				<i>G. duodenalis</i> : 0-33 cistos/L	
Área costeira (Tailândia) após ocorrência de Tsunami.	IMS e IFA	12 amostras em 2005: <i>Crypto</i> e <i>Giardia</i> 2 amostras positivas para cada. 12 amostras em 2008: <i>Crypto</i> e <i>Giardia</i> : 1 amostra positiva para cada.		Não estabelecido (dados considerados média geométrica: águas de torneira, rio, estuário, mar e poço).	Alagamento. Fezes de seres humanos e animais -Tsunami na região em 2004. Srisuphanunt et al, 2010.
Duas praias destinadas à recreação humana em Sinaloa (México).	IMS e IFA	Praia de Altata; <i>Crypto</i> : 71,0 % das amostras positivas; <i>Giardia</i> : 57,0 %. Praia de Mazatlan: <i>Crypto</i> : 83,0 % de positividade; <i>Giardia</i> : 72,0 %.		Concentração global para ambas as praias: <i>Crypto</i> : 150-2050/10L <i>Giardia</i> : 10-300 / 10L	Efluentes brutos Magana-Ordorica et al, 2010.
Quatro regiões marinhas da ilha de Florianópolis (Brasil).	IMS IFA, PCR e sequenciamento	Uma amostragem cada – regiões de cultivo de ostras. <i>Crypto</i> : não detectado .		Concentração não estimada.	Contaminação por efluente doméstico Souza et al, 2012
		<i>Giardia duodenalis</i>: assembleia A			
Amostras de água do mar negro (Turquia).	IFA e PCR	<i>Cryptosporidium</i> sp.: 78 amostras com oocistos (IFA). 44 positivas (PCR) <i>Cryptosporidium parvum</i>.		Concentração não estimada	Contaminação por esgoto Koloren et al., 2013
Quatro regiões do Estuário de Cananéia, São Paulo (Brasil).	IMS, IFA e PCR	<i>Giardia duodenalis</i> : Detecção em todos os pontos amostrados. <i>Cryptosporidium</i> spp. detectado em um ponto.		Não reportado.	Contaminação por esgoto doméstico; animais. Leal et al., 2013.

Quatro praias da costa central da (Venezuela)	IMS, IFA e PCR	<i>Cryptosporidium</i> : 20% das amostras positivas. <i>Giardia duodenalis</i> : 40% das amostras	<i>Cryptosporidium</i> spp: 0,2 – 2/L <i>Giardia</i> : 0,2 – 17/ L	Contaminação por esgotos	Betancourt et al., 2014
Estuário no nordeste de Melbourne (Austrália)	IFA	<i>Giardia</i> : 19% positivas <i>Cryptosporidium</i> : 13% positivas	0,1 a 0,2 (oo) cistos /L	Contaminação por derramamento de esgoto	Henry et al., 2016
Quatro regiões do Estuário de Cananéia, São Paulo (Brasil)	IMS, IFA e PCR e sequenciamento.	<i>Giardia</i> : 4 pontos de amostragem do estuário. Monitoramento mensal durante um ano. Detecção em todos os pontos amostrados.	Não reportado.	Contaminação por esgoto doméstico	Leal et al., 2018a
		<i>Giardia duodenalis</i> subassembleia AII <i>Giardia duodenalis</i> Assembleia C		Contaminação por fezes de cães.	
Água do mar de 12 praias São Paulo (Brasil).	IMS, IFA.	<i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Giardia</i> spp.	0.1 a 1.7 oocistos /L 0.1 a 66.1 cistos / L	Esgoto doméstico.	Pinto et al., 2020

Legenda:

IMS = Immunomagnetic Separation – Separação Imunomagnética; IFA= Immunofluorescence Assay – Ensaio de Imunofluorescência.

PCR= Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase; FISH= Fluorescence in Situ Hybridization – Hibridização Fluorescente *in Situ*

Fonte: Adaptado e atualizado de Robertson (2007) e Leal (2013).

Outro fator relevante a ser ponderado acerca da contaminação de águas oceânicas por protozoários refere-se à possibilidade de infecção de seres humanos mediante outras vias, como o consumo de alimentos marinhos contaminados (Fayer et al., 2004; Robertson, 2007).

Desta forma, alimentos derivados da maricultura como ostras, mexilhões e vieiras, podem atuar como bioindicadores de contaminação fecal devido ao seu modo de alimentação - mediante a filtração de partículas e detritos presentes no ambiente - e, bioacumular uma ampla gama de patógenos, entre eles *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* (Robertson et al., 2007; Souza et al., 2012; Tedde et al., 2019). Visto que estes animais são preferencialmente ingeridos crus ou mal cozidos, há uma maximização dos riscos em saúde pública (Fayer et al., 2004; Robertson, 2007).

No Brasil, o primeiro relato da contaminação de moluscos bivalves destinados ao consumo humano por oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi reportado no litoral de São Paulo por Leal et al., 2008. A presença do parasito foi identificada em tecidos branquiais de ostras e de vôngoles mediante reação de imunofluorescência direta utilizando anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium*. A estimativa do número de oocistos encontrada por animal - 60 oocistos por vôngole e de 12 oocistos por ostra, revelou que pode haver um risco potencial de infecção, especialmente para a população autóctone mediante ingestão destes bivalves.

Posteriormente, outros estudos foram conduzidos no país com o intuito de verificar a contaminação por protozoários em moluscos bivalves destinados à alimentação humana (Souza et al., 2012; Leal et al., 2013; Couto et al., 2016). Portanto, estudos que realizem o levantamento de informações acerca da epidemiologia ambiental e molecular de protozoários patogênicos em áreas costeiras e relacionados ao consumo

de alimentos marinhos advindos da maricultura fornecem dados importantes para secretarias de vigilância em saúde epidemiológica e ambiental no Brasil.

2.4 *Giardia* spp. e giardiose.

São reconhecidas como válidas atualmente oito espécies de *Giardia* o que inclui a recentemente descrita *Giardia cricetidarum* em hamsters e *Giardia peramelis* em marsupiais que habitam a Oceania - *bandcoots* (Hillman et al., 2016, Lyu et al., 2018). Outras espécies infectam uma ampla gama de hospedeiros vertebrados, tais como anfíbios, aves e mamíferos (Tabela 4).

Entretanto, somente *Giardia duodenalis* (sinonímia *G. lamblia* e *G. intestinalis*) apresenta potencial infectante para seres humanos, sendo considerado um complexo de espécies subdividido em oito assembleias ou genótipos - grupos genéticos - (A até H) (Cetard et al., 2017; Thompson e Ash, 2019).

As assembleias A e B são as mais frequentemente identificadas em infecções humanas e, as assembleias C-H apresentam especificidade parasitária por diversos animais (Heyworth et al., 2016; Cacciò et al., 2018).

Contudo, algumas assembleias que apresentam especificidade por animais, já foram detectadas em amostras fecais de seres humanos (Heyworth, 2016; Ryan et al., 2019) (Tabela 4).

Tabela 4: *Giardia* spp. e especificidade parasitária

Hospedeiros principais	Espécie	Assembleias	Comentários
Humanos e outros mamíferos	<i>G. duodenalis</i>	A	Principal assembleia em humanos
		B	Principal assembleia em humanos
Canídeos		C^{CH}	8 ^{CH}
		D^{CH}	6 ^{CH}
Gado		E^{CH}	59 ^{CH}
Gatos		F^{CH}	7 ^{CH}
Roedores		G	0 ^{CH}
Mamíferos marinhos (Pinípedes)		H	0 ^{CH}
Roedores	<i>G. muris</i>	-	
	<i>G. microti</i>	-	
Aves	<i>G. psittaci</i>	-	
	<i>G. ardeae</i>	-	
Anfíbios	<i>G. agilis</i>	-	
Hamsters	<i>G. cricetidarum</i>	-	
Bandicoots	<i>G. peramelis</i>	-	

Legenda:

^{CH}: Assembleias que apresentam especificidade por animais e número de casos reportados em humanos (Adaptado de Heyworth, 2016; Xiao e Feng, 2017; Ryan et al., 2019).

Entre as assembleias mais frequentemente reportadas em seres humanos, A ocorre em 37% das infecções e, B corresponde a 58% pelo protozoário parasito em todo o mundo (Ryan e Caccio 2013; Ankarklev et al., 2018). Estas são subdivididas em subassembleias, que em maior ou menor grau, exibem também preferência por determinados hospedeiros (Xiao e Feng, 2017). Mediante emprego de ferramentas moleculares, foi possível a compreensão de que dentro da assembleia A existe variabilidade genética, compondo assim três subassembleias: A-I, A-II e A-III, onde A-I

e A-II são comumente reportadas em humanos e A-III prevalece em animais (Mahmoudi, 2020).

Já para a assembleia B, duas subassembleias são descritas: B-III e B-IV sendo ambas reportadas em humanos, porém, com maior frequência a subassembleia B-IV. Esta última é inclusive a mais frequentemente reportada em manipuladores de alimentos no mundo - prontos para o consumo humano - parasitados pelo protozoário e, a subassembleia B-III apresenta importância zoonótica (Ankarklev et al., 2018; Ryan et al., 2019).

A giardiose é uma doença cosmopolita que acomete aproximadamente 280 milhões de pessoas a cada ano no mundo, principalmente crianças de até cinco anos de idade (Einarsson et al., 2016).

Mediante revisão sistemática conduzida para identificar os estudos publicados em relação à *Giardia duodenalis* entre os anos de 1995 até 2015 no Brasil, foi possível compilar importantes dados em amostras hídricas, de animais – silvestres, domésticos e de produção – e prevalência e genotipagem de isolados do protozoário em seres humanos, incluindo a população indígena, demonstrando ampla distribuição da parasitose nas cinco regiões do país (Coelho et al., 2017).

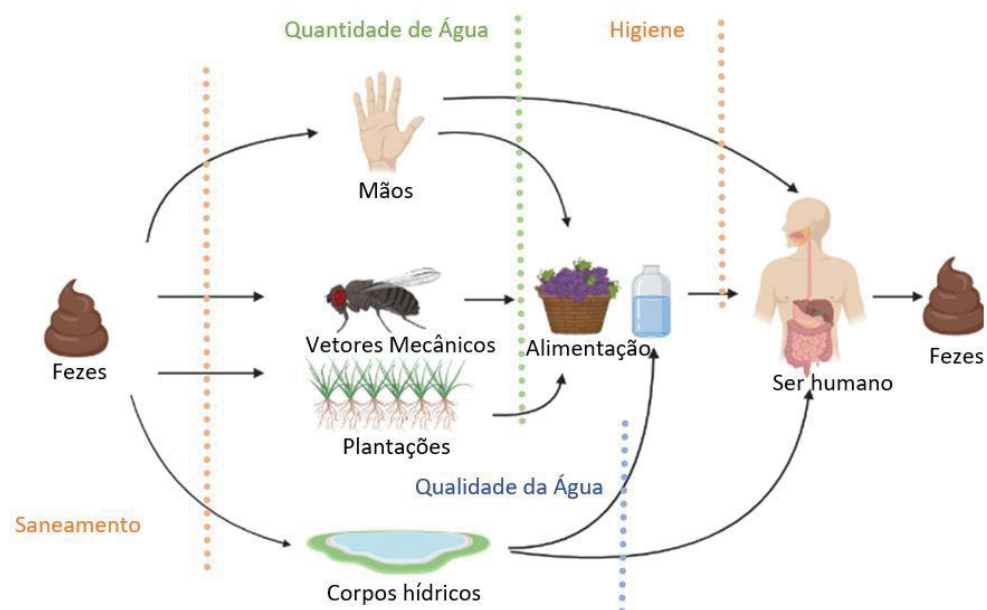
A maior parte dos estudos envolvendo a infecção por *Giardia duodenalis* em seres humanos se concentra nas regiões sul e sudeste do Brasil. Entre todos os estados do país, destacam-se com uma prevalência superior a 30.0% os estados de São Paulo, Minas Gerais, Sergipe, Maranhão, Amapá e Paraná. Além disso, a assembleia A foi detectada mais frequentemente em amostras clínicas em detrimento da B, sendo que todas as cinco principais subassembleias já foram identificadas e a parasitose é considerada endêmica no país (Coelho et al., 2017).

A metodologia atual para a caracterização das assembleias de *Giardia duodenalis* é feita por ferramentas de biologia molecular para amplificar e sequenciar fragmentos de genes. Os principais *loci* empregados para este fim são: TPI (triosefosfato isomerase), BG (β -giardina), GDH (glutamato desidrogenase) e o gene 18S (Wang et al., 2019; Ryan et al., 2019). Estes também são os principais marcadores moleculares para a detecção do protozoário em amostras ambientais.

A rota de transmissão fecal-oral permite que esse protozoário exiba uma variedade de mecanismos de transmissão, o que aumenta as possibilidades de infectar seres humanos, seja por via antroponótica ou zoonótica. A veiculação hídrica e alimentar apresenta maior expressividade para a transmissão da protozoose (Plutzer e Karanis, 2016; Efstratiou et al., 2017; Ryan et al., 2019).

Além de água e alimentos contaminados com cistos, há outras formas do parasito infectar seu hospedeiro, como o contato interpessoal e com animais parasitados (pessoa – animal) e também, sendo disseminada para superfícies, objetos e alimentos por vetores mecânicos (Figura 3).

Figura 3: Rotas de transmissão de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. por contato direto e indireto



(Adaptado e modificado de Instituto Trata Brasil, 2019).

A dose infectante para início da infecção é baixa - apenas a ingestão de 10 cistos, sendo os cistos eliminados infectantes nas fezes dos hospedeiros parasitados (Kucik et al., 2004; Leung et al., 2019). O período de incubação varia de 6 a 15 dias em média. Há tratamento disponível contra o protozoário, geralmente com a aplicação de derivados nitroimidazólicos, embora seja relatada dificuldade de término do tratamento devido a efeitos colaterais e também, já ter sido evidenciado potencial carcinogênico de alguns fármacos em modelos murinos (Watkins e Eckmann 2014; Vivancos et al., 2018).

O ciclo biológico do protozoário apresenta duas formas evolutivas: a forma proliferativa, o trofozoíto e a forma infectante e de resistência aos estressores ambientais, o cisto. O desenvolvimento do protozoário é estabelecido após a ingestão do cisto por um hospedeiro susceptível. A excitação ocorre inicialmente pela presença de ácidos estomacais e ao chegar ao duodeno, a tripsina e a bile estimula a parede do cisto a se dissolver, dando origem a uma célula tetranucleada que imediatamente se divide formando dois trofozoítos binucleados que se ligam ao epitélio intestinal, multiplicando-se assexuadamente (Einarsson et al., 2016).

O quadro clínico pode surgir durante a fase em que o protozoário está em sua forma proliferativa - trofozoíto, especialmente após estes conseguirem se aderir às microvilosidades dos enterócitos intestinais mediante fixação do disco adesivo (suctorial) presente na parte ventral de *Giardia* (Palm et al., 2005; Vivancos et al., 2018). A fixação pode desencadear redes de sinalização específicas, incluindo as caspases, que assim ativam a apoptose celular (Cetard et al., 2017; Leung et al., 2019). Isso leva a perda de junções intercelulares, rearranjo do citoesqueleto dessas células e disfunção da barreira entre o lúmen intestinal e as células epiteliais, o que desencadeia

mecanismos fisiopatológicos, como a liberação de eletrólitos e a má absorção e diarreia (Cetard et al., 2017).

A giardiose apresenta ampla relevância, especialmente para a população em idade pediátrica, sendo importante causa de falha do desenvolvimento físico e cognitivo em crianças, induzindo também à má absorção de vitaminas lipossolúveis, perda de peso e em alguns casos à esteatorreia (Ankarklev et al., 2010; Einarsson et al., 2016).

Um importante fator atualmente discutido consiste nas infecções crônicas pelo parasito ou nos efeitos decorrentes da mesma por longos períodos pós-infecção (até 10 anos) gerando complicações como a síndrome do intestino irritável (IBS), fadiga crônica e predisposição a alergias alimentares (Bartelt e Sartor, 2015; Einarsson et al., 2016; Vivancos et al., 2018; Litleskare et al., 2018).

As manifestações clínicas da fase crônica da doença pôde ser melhor compreendida após a investigação de alguns surtos de veiculação hídrica, responsáveis por ocasionar gastroenterite em humanos. Entre estes, o surto de Bergen, Noruega ocorrido em 2004 merece especial menção, por acometer 1.252 indivíduos devido a contaminação de um dos reservatórios municipais de água destinada ao consumo humano, pelo rompimento de tubulações e encanamentos de esgoto (Nygård et al., 2006; Litleskare et al., 2018). Além disso, um terço dos indivíduos sintomáticos infectados por *Giardia duodenalis* que adquiriram a parasitose em situações não relacionadas a surtos de veiculação hídrica, (casos esporádicos) reportaram manifestações extraintestinais como artrite reumatoide, problemas oftálmicos, uretrites e problemas cutâneos (Cantey et al., 2011).

O protozoário protagoniza uma das maiores infecções de gastroenterite causadas por parasitos por esta via (Karanis et al., 2007; Baldursson e Karanis, 2011; Efstratiou et al., 2017). As principais fontes hídricas apontadas como causas de surtos no mundo se

referem à água destinada ao consumo humano, falhas no tratamento de água, contaminação de reservatórios, contaminação pós-tratamento e, de modo emergente, a contaminação de águas superficiais destinadas à recreação. Este amplo sucesso de transmissibilidade por esta via também se deve à resistência do protozoário ao cloro e seus derivados utilizados para potabilizar a água (Baldursson e Karanis 2011; Coelho et al., 2017; Efstratiou et al., 2017).

Em países da América Latina, a ocorrência de protozoários de veiculação hídrica em amostras de água demonstra a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. como os protozoários mais frequentemente identificados em mananciais (Rosado-García et al., 2017). Segundo os mesmos autores, entre os países desta região o Brasil lidera os relatos e número de pesquisas acerca de protozoários parasitos transmitidos pela água com 30,3% (20/66), seguido da Argentina, Colômbia e outros. Além disso, o estudo aponta que somente o Brasil e a Colômbia apresentam uma legislação que contempla a pesquisa destes protozoários patogênicos em água destinada ao consumo humano.

2.5 *Cryptosporidium* spp. e criptosporidiose.

O gênero *Cryptosporidium* foi identificado primariamente por Ernest E. Tyzzer em 1907 em glândulas gástricas de camundongos, sendo descrito como *Cryptosporidium muris*. Alguns anos mais tarde, em 1912, o mesmo pesquisador identificou a presença de oocistos no intestino delgado de camundongos, nomeando-o como *Cryptosporidium parvum*, considerada até hoje a principal espécie zoonótica do protozoário (Tyzzer, 1912; Ortega-Pierres et al., 2009; 2018).

A criptosporidiose foi reconhecida primariamente pela medicina veterinária como uma importante causa de diarreia e de óbitos em animais como perus jovens infectados por *Cryptosporidium meleagridis* e posteriormente em bezerros parasitados por *Cryptosporidium parvum*, sendo a infecção por esta última espécie, já identificada no gado bovino de todo o planeta (Fayer et al., 1997; Fayer et al., 2009).

Entretanto, sua real importância em seres humanos se deu apenas após o advento da pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em 1982, quando o *Centers for Disease Control* dos Estados Unidos notificou a presença de uma diarreia debilitante, que não cessava com a administração de nenhum medicamento, em 21 pacientes do sexo masculino em seis grandes cidades americanas. A investigação revelou que o agente etiológico responsável pela diarreia profusa era *Cryptosporidium* e todos os 21 pacientes eram portadores do vírus da imunodeficiência adquirida - HIV, o que despertou na ocasião, o interesse em se estudar após 75 anos de sua descoberta, o parasito que emergia como uma nova infecção de caráter oportunista de importância em indivíduos imunodeficientes (Morbidity and Mortality Weekly Report, 1982; Goldfarb, 1982).

Posteriormente, se comprovou que a infecção também acometia indivíduos imunocompetentes após a ocorrência de surtos de veiculação hídrica tendo como agente etiológico *Cryptosporidium* spp. em cidades como San Antonio (Texas) e Milwaukee (Wisconsin) ambas nos Estados Unidos, onde grande número de pessoas se infectaram desenvolvendo diferentes quadros clínicos da doença (D' Antonio et al., 1985; Mackenzie et al., 1994).

Diante deste histórico, percebeu-se que o que delimita a severidade da doença é a relação do “status” imunológico de cada hospedeiro e, a eficácia da ativação de resposta

imune celular, bem como a contagem de linfócitos T CD4, sendo esta agravada e tornando-se uma infecção de caráter oportunista quando abaixo de 100 células /mm³. Nesta situação, ocorre má absorção intestinal, significativa perda de peso, severa diarreia e elevadas taxas de óbitos, inclusive, com migrações do protozoário para sítios extraintestinais como ductos biliares, fígado, pulmão e pâncreas ocasionando também pancreatite (Wang et al., 2018).

O quadro clínico de maior severidade supramencionado é observado especialmente em pacientes com SIDA, que não fazem uso da terapia antirretroviral (HAART) e, em categorias populacionais mais vulneráveis ou mais expostas, como outros indivíduos imunossuprimidos e imunodeficientes: idosos, transplantados, pacientes renais crônicos, aqueles que necessitam realizar hemodiálise ou quimioterapia para tratar neoplasias, diabéticos, devido ao uso prolongado de corticosteroides e crianças com desnutrição crônica. Para todos que compõe este grupo, a ingestão de apenas um oocisto do protozoário é capaz de iniciar a infecção podendo ter término fatal (Rose et al, 2002; Kotloff et al., 2013; Wang et al., 2018; Madadi et al., 2020).

Além disso, atualmente a criptosporidiose é considerada a segunda maior causa de mortalidade em crianças de até cinco anos em todo o mundo, somente sobrepujada pelas infecções por rotavírus (Wang et al., 2018). Não há nenhuma vacina validada para *Cryptosporidium* spp., nem um tratamento eficaz que promova a cura parasitológica, apesar da utilização da Nitazoxanida ser o fármaco de escolha pela FDA, demonstrando entretanto, apenas a diminuição do número de evacuações diarreicas em crianças e, nenhum efeito em indivíduos HIV / SIDA (Thompson et al., 2005; Checkley et al., 2015).

Cryptosporidium spp. infecta as cinco classes de vertebrados, incluindo seres humanos e outros mamíferos - animais domésticos e silvestres (Feng et al., 2011), e especialmente animais de produção, apresentando grande importância veterinária e interesse econômico (Zhou et al., 2004).

Atualmente são aceitas 38 espécies de *Cryptosporidium* das quais 17 já foram relatadas em seres humanos mundialmente (Tabela 5) (King et al., 2019). Destas, *C. parvum* e *C. hominis* são responsáveis pela maioria das infecções, apresentando subtipos que exibem graus diferenciados de patogenicidade e virulência (Araújo et al., 2011; Ryan et al., 2014).

O principal gene utilizado para confirmação da infecção de seres humanos ou de sua presença em amostras ambientais é o que codifica a subunidade *18S rRNA*, comum a todas as espécies (Xiao et al., 2001). São reconhecidos atualmente pelo menos 15 subtipos de *Cryptosporidium parvum* (IIa a IIo), sendo estes identificados com base na sequência parcial da análise do gene da glicoproteína de 60 KDa (GP60). Alguns subtipos, especialmente IIc, até agora apenas foi encontrado em humanos, sendo comprovadamente uma cepa antroponótica, mas outras famílias, incluindo IIa e IId, são encontradas em humanos e ruminantes e responsáveis pela criptosporidiose zoonótica. Em particular, IIa é a família de subtipos mais frequentemente relatada em bovinos em todo o mundo (Ryan et al., 2014; Ramo et al., 2016; King et al., 2019). *C. parvum* IIc é o mais comum em países emergentes onde há saneamento precário e com baixo IDH (King et al., 2019).

Ao traçar um paralelo entre as duas principais espécies de *Cryptosporidium* que infectam humanos, *C. parvum* apresenta um amplo espectro de hospedeiros, ao passo que *C. hominis* parasita quase que exclusivamente seres humanos tendo baixo potencial

zoonótico (Shapiro et al., 2013). Os principais subtipos de *C. hominis* são subdivididos de Ia-Ik, porém o subtipo Ib é o mais comumente encontrado em países desenvolvidos, sendo responsável pelo grande surto de Milwaukee, ocorrido nos EUA (Soba e Logar, 2008). Entretanto, em países emergentes observa-se uma maior variabilidade de subtipos em infecções de seres humanos como: Ia, Ib, Id, Ie, e If (Leav et al., 2002; Khan et al., 2018).

Tabela 5: Espécies de *Cryptosporidium* e potencial infectante para humanos

Espécies	Hospedeiro	Local de infecção	Relatado em humanos
<i>C. avium</i>	Aves	Ceco	
<i>C. andersoni</i>	Gado	Abomaso	✓
<i>C. agni</i>	Cordeiros	Intestino	
<i>C. baileyi</i>	Aves	Cloaca, bursa e traquéia	
<i>C. bovis</i>	Gado	Intestino delgado	✓
<i>C. canis</i>	Cachorros	Intestino delgado	✓
<i>C. cervine</i>	Coelhos		
<i>C. cuniculus</i>	Coelhos	Intestino	✓
<i>C. ducismarci</i>	Tartarugas	Intestino delgado	
<i>C. erinacei</i>	Ouriço e cavalos		✓
<i>C. fayeri</i>	Canguru e marsupiais	Intestino delgado	✓
<i>C. felis</i>	Gatos	Intestino delgado	✓
<i>C. fragile</i>	Sapos	Estômago	
<i>C. galli</i>	Aves	Proventrículo	
<i>C. hominis</i>	Humanos	Intestino delgado	✓
<i>C. huwi</i>	Peixe	Estômago e intestino	
<i>C. macropodum</i>	Marsupiais	Intestino delgado	
<i>C. meleagridis</i>	Peru, Aves e humanos	Intestino delgado	✓
<i>C. muris</i>	Camundongo e roedores	Estômago	✓
<i>C. molnari</i>	Peixe	Estômago e intestino	

<i>C. nasorum</i>	Peixe	Estômago e intestino	
<i>C. occultus</i>	Ruminantes		
<i>C. parvum</i>	Ruminantes	Intestino delgado	✓
<i>C. pestis</i>	Bovinos	Intestino delgado	
<i>C. proliferans</i>	Roedores e ruminantes		
<i>C. ryanae</i>	Gado	Intestino delgado	
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes	Intestino e estômago	
<i>C. scrofarum</i>	Porcos	Intestino	✓
<i>C. serpentis</i>	Cobras	Estômago	
<i>C. saurophilium</i>	Lagartos e cobras		
<i>C. suis</i>	Porcos	Intestino delgado e grosso	✓
<i>C. testudinis</i>	Tartarugas		
<i>C. tyzzeri</i>	Camundongo e roedores	Intestino delgado	✓
<i>C. ubiquitum</i>	Gado, ruminantes, roedores e primatas	Intestino	✓
<i>C. varanii</i>	Lagartos	Estômago e intestino delgado	
<i>C. viatorum</i>	Humanos	Intestino delgado	✓
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos e caprinos	Intestino delgado	✓
<i>C. wrairi</i>	Porco da Índia	Intestino	

Fonte: Khan et al., 2018

As espécies *C. hominis* e *C. parvum*, além de serem responsáveis por mais de 90.0% das infecções em seres humanos, são importantes para fornecer clareza do modo de transmissão, além de serem relevantes na epidemiologia da doença, especialmente quando em situação de surtos (Xiao et al., 2010).

As mesmas vias de transmissão da giardiose mediante rota fecal-oral podem ser apontadas também como fontes de infecção para diferentes espécies de

Cryptosporidium (Figura 3), com a adição da possibilidade de transmissão de oocistos mediante inalação de aerossóis e, como via secundária de transmissão o contato sexual, através do contato anal-oral (Hunter e Thompson 2005; Smith et al., 2007; Xiao et al., 2010; Ryan et al., 2018).

Após a ingestão dos oocistos, leva-se em média três dias (variância de 1 a 8 dias) para o protozoário desenvolver seu ciclo biológico dentro do organismo dos diferentes hospedeiros, onde se alternam o processo de reproduções assexuadas (merogonias) e reprodução sexuada (gametogonia). As espécies de *Cryptosporidium* se desenvolvem nas superfícies apicais de enterócitos, principalmente no intestino. O desenvolvimento é considerado intracelular, porém o parasito ocupa caracteristicamente a localização extracitoplasmática (microvilosidades) nas células hospedeiras (Fayer, 1997; Abdul et al., 2017).

O processo de fixação dos esporozoítos é mediado pela lectina (galactose-N-acetilgalactosamina), mecanismo esse já usado por outros protozoários parasitos para adesão e / ou invasão de células hospedeiras (Certad et al., 2017). Desta forma, nesta localização ocorre a internalização do parasito dentro de um compartimento extracitoplasmático, revestido pela membrana da célula hospedeira, denominada de vacúolo parasitóforo (Barta e Thompson, 2006). Por consequência da interação entre o parasito e a superfície apical da célula ocorre a ativação de cascatas de sinalização resultando em um rompimento da barreira de células e polimerização dos filamento de actina, na região da interação parasito-hospedeiro (Cetard et al., 2017).

O principal local de contato entre o parasito em maturação e a célula hospedeira é uma estrutura de membrana extensivamente dobrada, chamada de organela alimentar multi-membranosa, que está envolvida na captação de nutrientes da célula hospedeira,

onde há um transporte seletivo dos mesmos entre hospedeiro e parasito, que ocorre na região apical dos enterócitos (Zapata et al., 2002; Barta e Thompson, 2006). O protozoário estimula a secreção de moléculas como: fosfolipases, proteases e hemolisinas que podem causar danos celulares, aumentando a secreção de fluídos das criptas e contribui para a diarreia e má absorção e assim morte celular (Cetard et al., 2017).

Até pouco tempo, o protozoário era classificado como um coccídio intestinal intracelular obrigatório, de localização extracitoplásmica, pertencente ao Filo Apicomplexa. Entretanto, atualmente com base em novos estudos morfológicos e moleculares, o parasito foi reclassificado e inserido na Classe Gregarinomorpha – subclasse: Cryptogregarina. Esta realocação justifica-se devido ao seu comportamento ser semelhante ao apresentado pelas gregarinas (parasitos intestinais de invertebrados marinhos, água doce e terrestres e de alguns vertebrados) epicelulares e, devido à sua habilidade de completar seu ciclo biológico na ausência de hospedeiros e em meio extracelular, por exemplo biofilmes *in vitro* (Ryan et al., 2016).

Os oocistos podem ser inativados por congelamento, pasteurização e, também, mediante a fervura durante um minuto, porém são resistentes a grandes oscilações de temperaturas ambientais e resistentes por meses até anos tanto em águas doces como salinas (Tamburrini e Pozio, 1999; Abdul et al., 2017). Além disso, são altamente resistentes ao cloro e seus derivados: oocistos mantidos por até 120 minutos em alvejantes como hipoclorito de sódio até 5,25% de concentração - foram capazes de infectar camundongos mediante bioensaio após inoculação por gavagem (Fayer, 1995; Huang e White 2006);

Devido à natureza robusta dos oocistos e extrema resistência aos desinfetantes utilizados para potabilizar a água, numerosos surtos são causados pelo parasito em escala mundial (Karanis et al., 2007; Baldursson e Karanis, 2011; Efstratiou et al., 2017). O maior surto mundial de criptosporidiose ocorreu nos Estados Unidos em 1993, onde uma pequena fração de oocistos / L ultrapassou a etapa de filtração da Estação de Tratamento de Água localizada na cidade de Milwaukee, estado de Wisconsin, sendo distribuída em massa para a população (Mackenzie et al., 1994). O número total de indivíduos infectados foi de 403.000 em uma cidade com população de pouco mais de 1,5 milhão de habitantes na ocasião do surto, tendo ocorrido 100 óbitos em indivíduos imunodeficientes.

Cryptosporidium apresenta distribuição cosmopolita tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento ou emergentes, sendo o segundo patógeno mais detectado em corpos hídricos e, responsável por mais de 30.000 casos de criptosporidiose por ano somente nos Estados Unidos (Efstratiou et al., 2017). Segundo os mesmos autores, o protozoário *Cryptosporidium* foi relatado como causa de 63% dos surtos de veiculação hídrica ocorridos no mundo (n = 381) no período de 2011 a 2016.

A criptosporidiose é atualmente a doença gastrointestinal mais reportada em surtos em águas recreacionais em piscinas e parques aquáticos nos EUA, sendo o parasito popularmente conhecido como “*The swimming pool parasite*” (CDC, 2018, Gharpure et al., 2019) e identificado pela primeira vez recentemente no Brasil em piscinas públicas descobertas tratadas somente por cloração (Pineda et al., 2020).

Entre os anos de 2009 a 2017, 444 surtos ocorreram em 40 estados Norte Americanos e, 183 (41.2%) foram ocasionados pela ingestão acidental de águas recreacionais tratadas ou não (Gharpure et al., 2019).

Na América Latina, de 1979 até 2015 apenas 16 relatos de surtos devidamente documentados causados por protozoários foram registrados, sendo os mais frequentes provocados por *Toxoplasma gondii* e *Cyclospora cayetanensis* (Rosado-García et al., 2017). Os autores destacam que a maioria dos países da região ainda não conseguiu realizar a detecção de protozooses de veiculação hídrica, embora neste caso também, o Brasil lidere o número de estudos e relatos acerca de *Cryptosporidium* spp. em águas brutas, tratadas e também em águas áreas costeiras destinadas à recreação humana (Coelho et al., 2017; Rosado-García et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar o monitoramento ambiental de protozoários patogênicos e indicadores bacteriológicos de contaminação fecal nas principais praias do litoral paranaense destinadas à recreação humana, por um período de dois anos, como instrumento de aferição de qualidade sanitária e balneabilidade.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar se rios e canais que afluem para o mar contribuem com a contaminação e introdução de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. nestes ambientes.
- Detectar e quantificar a ocorrência e concentração de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água do mar de três praias do litoral paranaense.
- Realizar ensaios de biologia molecular como ferramenta complementar de confirmação da contaminação de rios e água do mar por cistos e oocistos dos protozoários supracitados.
- Avaliar a qualidade microbiológica dos corpos hídricos e água do mar das principais praias do Paraná durante dois anos.
- Compilar, analisar e fornecer dados microbiológicos e parasitológicos ao órgão ambiental competente como subsídio para proposição de legislação estadual de balneabilidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do local de estudo e pontos de coleta das amostras de água

As coletas de amostras hídricas (rio, canais e água do mar) foram realizadas em três praias do litoral paranaense. O Instituto Ambiental do Paraná (IAP) é o órgão responsável pelo monitoramento da qualidade das praias e parceiro no presente estudo (Anexo 1). As praias pertencentes a Guaratuba (praia do Brejatuba), Caiobá (praia Mansa) e Matinhos (praia de Riviera) foram selecionadas contemplando os devidos pontos já utilizados e georreferenciados por essa instituição. Para tanto, seis pontos (três para água de rio / três para água do mar) (Figura 4) foram analisados durante 24 meses com periodicidade mensal de janeiro de 2017 a dezembro de 2018 conforme descrito a seguir:

- Ponto 1: Rio de Guaratuba (25°53'17.5"S 48°34'02.0"W);
- Ponto 2: Mar de Guaratuba (25°53'17.1"S 48°34'00.5"W);
- Ponto 3: Canal de Caiobá (25°49'57.5"S 48°32'11.2"W);
- Ponto 4: Mar de Caiobá (25°49'56.6"S 48°32'04.3"W);
- Ponto 5: Rio de Matinhos (25°48'45.0"S 48°31'55.6"W);
- Ponto 6: Mar de Matinhos (25°48'42.3"S 48°31'50.5"W).

Ao todo, 144 amostras foram coletadas e analisadas ($n = 24$ amostras / ponto) sendo 72 amostras de rio e 72 amostras de água do mar. Durante todo o primeiro ano e em parte do segundo ano de monitoramento, as coletas foram acompanhadas por pessoal do Laboratório de Microbiologia do IAP.

Figura 4: Pontos de coleta de água do rio e água do mar das três praias monitoradas por um período de dois anos no litoral do Paraná.



Ponto 5: Rio de Matinhos



Ponto 6: Mar de Matinhos



Ponto 3: Canal de Caiobá



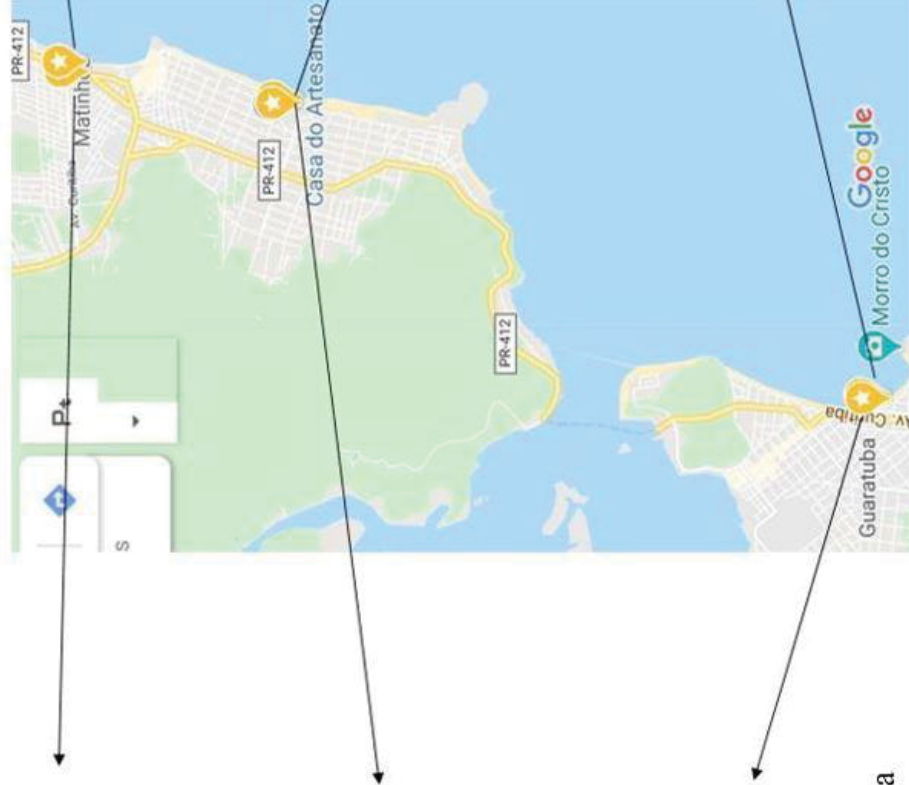
Ponto 3: Mar de Caiobá



Ponto 1: Rio de Guaratuba



Ponto 2: Mar de Guaratuba

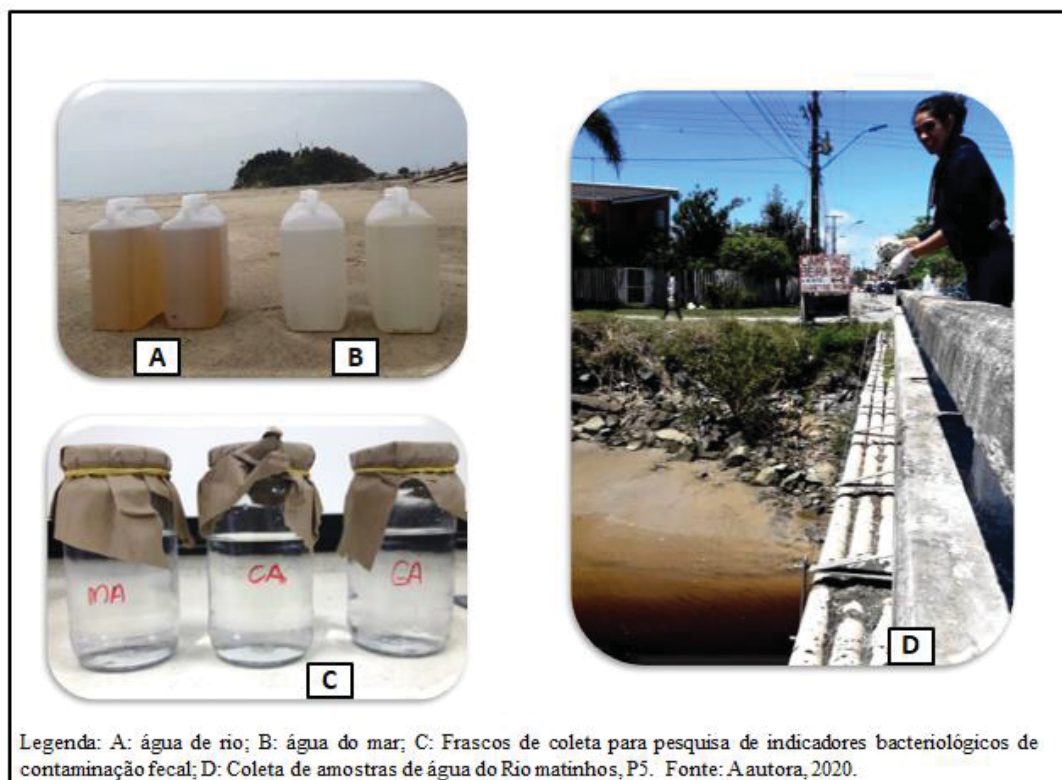


4.1.2 Procedimentos de coleta das amostras

Foram coletados volumes de 10L de água do mar e 10L de água do rio mensalmente (Figura 5 A e B) em galões higienizados e previamente tratados com solução de eluição Tween 80 (0,1 %), a aproximadamente um metro de profundidade para posterior análise em laboratório. Para a pesquisa de bactérias indicadoras, as amostras foram coletadas utilizando-se frascos com capacidade de 250 mL previamente autoclavados e tratados com reagente quelante (Figura 5 C) conforme preconização do *Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater* (AWWA, 2012).

Os procedimentos de coleta das amostras foram realizados com a utilização de luvas, balde (higienizado e eluído) e uma corda para alcançar os pontos de difícil obtenção (Figura 5 D) sendo as amostras identificadas de acordo com o ponto amostral, e transportadas refrigeradas para o Laboratório de Parasitologia Ambiental, do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Figura 5: Procedimento de coleta de amostras hídricas de praias do litoral do Paraná.



4.2 Detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras hídricas

4.2.1 Filtração das amostras de água

As amostras de água do mar e rio foram processadas pela técnica de filtração em membranas de ésteres mistos de celulose (47 mm de diâmetro, porosidade nominal de 3µm) de acordo com Franco et al., 2001, com modificações para adequação à preconização do método 1623.1 da USEPA (United States Environmental Protection Agency) (USEPA, 2012). 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 de cada membrana foi raspada durante 10 minutos com alça plástica macia seguida de lavagens manuais (10 minutos) com solução surfactante (Tween 80, 0,1 %).

O líquido resultante da etapa de eluição foi transferido para tubos cônicos e concentrados por centrifugação (1500 x g por 15 minutos). O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante lavado em água destilada e, novamente submetido à centrifugação, nas mesmas condições.

Após o descarte do sobrenadante, o sedimento desta segunda centrifugação foi transferido para tubos de microcentrífuga e mantido sob refrigeração à 4° C até a realização da pesquisa de cistos e oocistos por Reação de Imunofluorescência Direta (RID).

4.2.2 Visualização dos parasitos por reação de imunofluorescência direta e critérios de positividade.

Todas as 144 amostras de água do mar e de rio foram analisadas por reação de imunofluorescência direta (RID). As lâminas foram confeccionadas a partir do procedimento operacional padronizado de acordo com as instruções do fabricante (Merifluor® Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio) com a utilização de anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* direcionados aos epítomos da parede dos oocistos e cistos respectivamente, mediante marcação dos protozoários pelo fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC).

Para tanto, cada amostra foi agitada em vórtex por 2 minutos e logo depois, invertida três vezes, para que a distribuição de cistos e oocistos fosse homogênea no tubo de *ependorf*. Após essa etapa, alíquotas de 10µL foram pipetadas de cada amostra e espalhadas cuidadosamente nos poços das lâminas de imunofluorescência, sendo mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente para secagem.

Em seguida, foram adicionados 10µL de metanol para a fixação do material. Após 10 minutos, foi acrescentada uma gota do reagente de detecção contendo os anticorpos monoclonais e uma gota do contra corante, sendo as preparações mantidas em câmara úmida e ao abrigo da luz por 30 minutos em placas de Petri.

A etapa de lavagem para a remoção do excesso dos reagentes e anticorpos foi realizada utilizando a solução tampão fosfato (pH 7,5) presente no kit Merifluor®, previamente diluída (1: 20). Em seguida, foram adicionados 20µL de DAPI sendo as preparações mantidas em câmara úmida e ao abrigo da luz por 10 min. Após essa etapa foram feitas três lavagens com tampão e uma lavagem com água destilada 1 min cada.

Em seguida, as lâminas foram mantidas em câmara de secagem com sílica em uma placa de Petri e após uma hora cada lâmina recebeu o meio de montagem e a lamínula.

A visualização dos protozoários foi feita em microscópio de epifluorescência equipado com um filtro de excitação na faixa de 450 a 490 nm e filtro de barreira de 520 nm. A confirmação da morfologia dos protozoários foi feita mediante a incorporação do corante vital DAPI e por DIC (Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial).

Os critérios de positividade adotados foram 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 (4 - 6µm) e o formato (ovoides 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. Além dos critérios de fluorescência e morfometria, utilizou-se o filtro de UV para DAPI e observação ou não da incorporação do corante vital sendo classificadas as seguintes características: a) coloração interna azul clara (sem núcleos distintos) com um aro / borda verde = DAPI- negativo; b) Coloração interna azul intensa e c) até quatro núcleos distintos azuis celestes - DAPI - Positivos.

Para o filtro de DIC, as seguintes características foram observadas e classificadas: a) oocisto de *Cryptosporidium* vazio “empty”; b) oocisto com estrutura amorfa e c) oocisto com estrutura interna (um a quatro esporozoítos / oocisto). A presença de características atípicas tanto internamente quanto na parede dos oocistos, também foi um critério de exclusão de positividade como: anexos, poros, um ou dois núcleos grandes preenchendo a célula, cristais e etc.

Para os cistos, os critérios de positividade foram o tamanho (8 – 18µm) e o formato arredondado a ovóide, e, o grau e intensidade de fluorescência verde-maçã brilhante predominante na parede dos cistos, de maneira uniforme, formando um anel típico. Os padrões estabelecidos para DAPI foram os mesmos descritos anteriormente. Para o filtro de DIC, quatro características foram observadas e classificadas: a) cisto de *Giardia* vazio “empty”; b) cisto de *Giardia* com estrutura amorfa; c) cisto de *Giardia* com um tipo de estrutura interna (núcleos 1 a 4, bem como sua disposição na célula, axonemas e corpos medianos); d) cisto de *Giardia* com mais de um tipo de estrutura interna. Os mesmos critérios de exclusão supramencionados foram adotados para *Giardia*.

4.2.3 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 de rio e água do mar foi calculada da seguinte forma de acordo com Franco et al., 2001.

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

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

4.2.4 Caracterização molecular de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Os ensaios de biologia molecular para espécies de *Cryptosporidium* foram feitos em Parceria com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB).

4.2.4.1 Extração do DNA genômico

Todas as amostras consideradas positivas para *Cryptosporidium* spp. nas leituras de RID foram submetidas à extração de DNA genômico. Para tanto, a extração foi realizada através de três ciclos de lise mecânica com aquecimento a 95°C por 5 min e congelamento a -80°C por 1 minuto conforme protocolo adaptado de Cacciò et al. (2012) e seguida da utilização de *kit* comercial DNeasy PowerSoil® (Qiagen, Germany) conforme as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA obtido das amostras foi mantido em freezer a -20°C, até o momento da realização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.2.4.2 Amplificação do DNA pela reação em Cadeia da Polimerase Dupla (*Nested-PCR*)

Para a detecção molecular do protozoário foram realizadas amplificações do gene da região *18S rRNA* comum a todas as espécies de *Cryptosporidium*. Dois ensaios de PCR foram realizados. Para as primeiras reações do primeiro ensaio foram utilizados os iniciadores externos, SSU - direto e reverso, amplificando um fragmento de

aproximadamente 1325 pares de bases e, os iniciadores internos 826 *SSU* rRNA direto e reverso ambos descritos por Xiao et al. (1999) amplificando um fragmento de 826pb aproximadamente.

O segundo ensaio de PCR foi realizado utilizando os iniciadores descritos por Silva et al. (2013). Os iniciadores utilizados na reação de *nested*-PCR estão representados no Quadro 1.

Quadro 1: Lista de iniciadores empregados para amplificação do fragmento *18S rRNA* de *Cryptosporidium* spp.

Número do ensaio de Nested-PCR	Primers	Sequência	Fragmento	Referência
Primeiro ensaio	SSU F	5'- TCTAGAGCTAATACATGCG - 3'	1325pb	Xiao et al., 1999
	SSU R	5'- CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA - 3'		
	826 F	5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG -3'	826 pb	
	826 R	5'- AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A - 3'		
Segundo ensaio	SHP1	5'- ACC TAT CAG CTT TAG ACG GTA GGG TAT - 3'	773pb	Silva et al., 2013
	SHP2	5'- TTC TCA TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG - 3'		
	SHP3	5'-ACA GGG AGG TAGTGA CAA GAA ATA ACA - 3'	611pb	
	SSU-R3	5'- AAG GAG TAA GGAACA ACC TCC A- 3'		

Para ambos os ensaios, foram utilizados 5µL de DNA de cada amostra, em volume final de 25 µL de solução *master mix*, contendo: 12,5 µl de água ultra pura q.s.p, 5µl de tampão 5X (contendo 1,5 mM de MgCl₂) 0,5mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 µM de cada iniciador (Exxtend® do Brasil) e 1,25U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega).

A segunda reação (*Nested*) foi realizada a partir de três réplicas de cada amostra com 2 µl dos produtos amplificados da primeira reação por tubo (Araujo et al 2011). Para esta reação foi utilizada uma mistura de PCR (“*master mix*”) com volume final de 25 µl contendo, água ultra pura q.s.p, 5 µl de tampão 5X (contendo 1,5 mM de MgCl₂), 0,5mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 µM de cada iniciador, 1,25 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega).

As reações utilizando os iniciadores de Xiao et al. (1999) foram submetidas a um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de 39 ciclos de amplificação compostos de desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 60°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 90 segundos; e um ciclo para extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a reação, as amostras foram mantidas a 4°C até serem retiradas do termociclador (Mastercycler Gradient, *Eppendorf*®).

As reações utilizando os iniciadores de Silva et al (2013) foram submetidas a um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos seguida de 39 ciclos de amplificação compostos de desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 56°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 60 segundos; e um ciclo para extensão final a 72°C por 7 minutos. A segunda reação de amplificação foi realizada nas mesmas condições da primeira.

4.2.4.3 Eletroforese em gel de agarose

A cada tubo contendo o produto amplificado foi adicionado 5 µl de tampão carreador de amostra 6X (Invitrogen™). Dez microlitros desta mistura foi aplicado em cada poço do gel de agarose 1,5% (Amersham Biosciences®) corado com 0,5 µl de GelRed® (Biotium) imerso em Tampão Tris – Borato - EDTA (TBE) 1X e dois microlitros de marcador de peso molecular (100bp Plus DNA Ladder Invitrogen™). O gel foi visualizado em fonte de luz ultravioleta de 302 nm em transiluminador e fotodocumentador. A imagem foi capturada através do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e o software Labworks (UVP).

4.2.4.4 Caracterização molecular pela técnica de sequenciamento direto

Para a determinação das sequências nucleotídicas, cada um dos produtos de amplificação foi purificado com o kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE® Health Care, UK) segundo a recomendação do fabricante. Em seguida à purificação, a concentração de DNA do material foi estimada em gel de agarose 2%, empregando o marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), a fim de que pelo menos 10 ng/µl de DNA purificado fossem enviados para o sequenciamento por Sanger. As sequências foram alinhadas e submetidas ao sistema BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool) para comparação com sequências homologas disponíveis de *Cryptosporidium* no banco de dados GenBank.

4.2.4.5 Caracterização molecular de cistos de *Giardia* spp.

Os ensaios de biologia molecular para espécies de *Giardia* foram feitos em parceria com o Laboratório de Genética da Universidade Regional de Blumenau (FURB) e também no Laboratório de Parasitologia Ambiental da UFPR.

Todas as amostras consideradas positivas para *Giardia* spp. por RID foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit DNA ZR Fungal / Bacterial DNA (Zymo Research®). A extração foi feita seguindo-se as recomendações do fabricante com a seguinte modificação: foi adicionado 300µL de amostra ao invés de 300µg e o DNA resultante ao final do processo foi eluído em 100µL da solução DNA Elution Buffer® e armazenado e conservado sob refrigeração a - 20°C. O DNA extraído foi submetido às reações de *nested* PCR para a detecção molecular do protozoário, mediante amplificação da região do gene TPI, conforme descrito por Sulaiman e colaboradores (2003).

Na primeira reação de PCR foram utilizados iniciadores externos, AL3543- 5'-AAATATGCCTGCTCGTCG – 3' e o AL3546- 5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3' amplificando um fragmento de 605 pares de base (pb). Para a primeira PCR foram feitas réplicas com volume final de 25µL cada, contendo: 5µL de DNA, 13,3 de água ultrapura Milli Q® q.s.p, 2,5µL de buffer 10X (contendo 1,5 mM de MgCl₂), 1µL de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 1,5 µL de cada iniciador (Exxtend) e 0,2U de Taq® DNA Polymerase (Genbiotech).

As reações foram incubadas em termociclador (Applied Biosystems®) com as seguintes condições: ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 45 segundos, extensão a

72°C por 60 segundos e por fim a extensão final no último ciclo a 72°C por 10 minutos. Após a reação as amostras foram mantidas a 4°C no termociclador até serem retiradas.

A segunda reação de PCR utilizou iniciadores internos para amplificar um fragmento de 530pb: AL3244- 5'-CCCTTCATCGGIGGTAACCTT-3' e AL3545- 5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3'. As réplicas da segunda reação foram feitas também para alcançar 25µL de volume, porém com 4µL de produto da reação anterior, 14,3 de água ultrapura Milli Q[®] q.s.p, 2,5µL de buffer 10X (contendo 1,5 mM de MgCl₂), 1µL de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 1,5 µL de cada iniciador (Exxtend) e 0,2U de Taq[®] DNA Polymerase (Genbiotech).

As condições para amplificação no termociclador da segunda PCR foram iguais a primeira. Para análise, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Ludwig Biotec[®]) 1% sob intensidade de corrente 6v/cm. O tamanho do fragmento foi estimado por comparação com o marcador de peso molecular 100pb Ludwig Biotec[®] DNA Ladder. Em cada poço foram adicionados um volume total de 7 µL, sendo 5 µL de amostra e 2 µL de GelRed[®] (Biotium) usado como corante intercalante de DNA. O gel foi visualizado em fonte de luz ultravioleta de 302 nm em iluminador e fotodocumentador.

Após a confirmação do fragmento de interesse o mesmo foi purificado utilizando kits comerciais das enzimas Exonuclease I e Fosfatase alcalina (Cellco Biotec do Brasil), seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, as amostras foram enviadas para empresa Macrogen (Coréia do Sul) para serem sequenciadas.

Os fragmentos sequenciados foram alinhados de forma manual com o auxílio do software ClustalW do software MEGA-X e submetidos ao sistema BLAST (Basic Local

Alignment and Search Tool) para comparação com sequências homologas disponíveis de *Giardia* no banco de dados GenBank.

4.3 Monitoramento microbiológico

A cada coleta, foi realizada a pesquisa de indicadores bacteriológicos de contaminação fecal (*Escherichia coli* e *Enterococcus* sp.) nos 6 pontos de amostragem concomitante à análise parasitológica. As análises microbiológicas para todo o ano de 2017 até a 5ª coleta de 2018 do estudo foram feitas em parceria com o Laboratório de Microbiologia do IAP sendo determinada pela técnica de tubos múltiplos, através do número mais provável (NMP) / 100 mL seguindo os critérios preconizados por *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (AWWA, 2012). A pesquisa dos indicadores iniciou-se em até 24 horas após a coleta.

Para determinação de *E. coli* utilizou-se o meio de cultura caldo Fluorocult® LMX Merck® - substrato fluorogênico MUG (4-metil umbeliferil-β-D-glicuronídeo) e para quantificação de enterococos o caldo Chromocult® Merck, substrato cromogênico X-GLU (5-Bromo-4-cloro-3 indolyl-β-D-glicopiranosídeo).

As amostras foram homogeneizadas com água fosfatada, seguida de diluição em concentrações decrescentes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Após a diluição, foram semeadas em tubos de *Durham* e incubadas a 35°C por 48h. Após a incubação, os tubos que apresentaram turvação e produção de gás foram considerados positivos e semeados em caldo MUG e X-GLU.

Para *E. coli* foram consideradas positivos os tubos que foram destacados com fluorescência ao serem expostos a uma lâmpada ultravioleta de 366 nm de comprimento

de onda, essa reação é em resposta a quebra do meio MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo) por meio da enzima β -glucuronidase, sendo os resultados positivos comparados com a tabela NMP.

Considerou-se positivo para enterococos tubos com coloração azul esverdeada, pois a quebra do substrato X-GLU (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-glucopiranosidase) realizada pela enzima β -D-glucosidase, caracteriza o gênero. O resultado foi verificado na tabela NMP correspondente.

A quantificação de bactérias indicadoras de contaminação fecal (*E. coli* e enterococos) em amostras hídricas coletadas a partir de agosto / 2018 foi determinada pelo método do substrato definido (Colilert® e Enterolert® - Idexx, São Paulo, Brasil) em parceria com o LACEN (Laboratório Central do Estado do Paraná) Unidade de Fronteira de Foz do Iguaçu. Para esta metodologia, o princípio da técnica dos tubos múltiplos é substituído por 97 cavidades contidas em uma cartela estéril, e os resultados expressos em NMP / 100 mL para cada indicador eventualmente presente na amostra, sendo os resultados expressos e calculados por uma tabela padrão pela combinação de cavidades positivas.

O volume de 100 mL de cada amostra foi aspirado com uma proveta graduada sendo então adicionado o meio Colilert®. Após a diluição do meio a amostra foi transferida para uma cartela estéril, sendo esta selada e incubada em estufa bacteriológica a temperatura de 35°C por 24 horas. Posteriormente, a concentração de *E. coli* foi determinada pela contabilização dos poços positivos que exibiram fluorescência em luz UV, decorrentes do metabolismo de MUG pela enzima β -glucuronidase.

Para quantificação do número mais provável de enterococos seguiu-se os passos iniciais supracitados, com adição do meio de cultura Enterolert® à amostra, e incubação da cartela a 41° C por 24 horas. Após esse período, a presença deste gênero

foi indicada pela degradação do nutriente indicador do Enterolert[®] (4-metilumbeliferona-D-Glucosido) pela enzima β -D-glucosidase. O número de poços positivos foi contado e a estimativa de enterococos contabilizada mediante tabela padrão de NMP / 100 mL.

4.4 Monitoramento de Parâmetros físico-químicos.

Os seguintes parâmetros físico-químicos foram monitorados durante 24 meses de amostragem: pH e salinidade com aparelho multisensor (Mpa-210[®]), temperatura da água com auxílio de termômetro (mensurados no momento da coleta) e turbidez com aparelho TD- 300[®] aferida no Laboratório de Parasitologia Ambiental da UFPR.

4.5 Análise estatística

No presente estudo, foi realizada a estatística descritiva com apresentação dos dados em tabelas e gráficos (ocorrência de protozoários patogênicos, indicadores bacteriológicos e físico-químicos nos diversos pontos estudados). Foram considerados os valores mínimos e máximos e a média para cada variável.

O teste de correlação de Pearson foi utilizado para verificação de associação entre a ocorrência de protozoários patogênicos na água do rio e do mar de cada ponto e indicadores microbiológicos (*E. coli* e *Enterococcus* sp.) e, fatores físico-químicos, sendo todas as variáveis correlacionadas em pares para cada ano individualmente e considerando ambos os anos do estudo.

A associação entre a ocorrência de protozoários patogênicos, fatores físico-químicos em água do mar e de rio e cada estação do ano durante o período total de monitoramento (dois anos), também foi efetuada mediante a utilização do mesmo teste descrito acima, visando aferir se havia ou não influência de sazonalidade.

Os testes foram considerados estatisticamente significativos quando obtidos valores inferiores a $p \leq 0,05$. Para tanto, os dados foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel® 2010 e as correlações feitas mediante utilização do programa de Bioestatística Bioestat®.

5. RESULTADOS

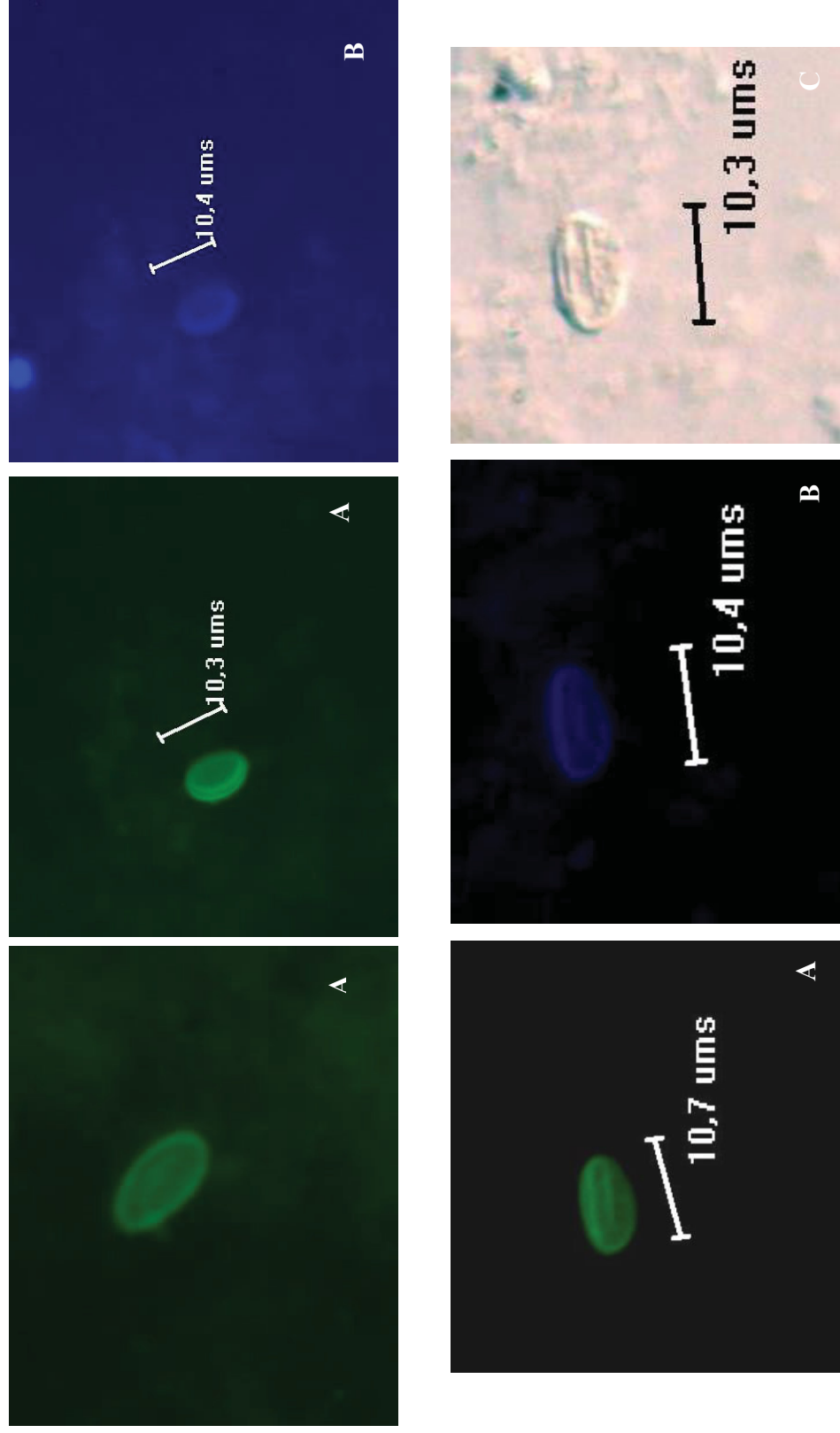
5.1 Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em corpos hídricos dulcícolas e água do mar nas praias de Guaratuba, Caiobá e Matinhos.

No total, 144 amostras hídricas foram analisadas para pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia* por reação de imunofluorescência direta. A ocorrência de ambos os protozoários foi detectada em todas as praias durante o período do estudo. Em 24 meses de monitoramento, de seis pontos referentes às três principais praias do estado do Paraná, pelo menos um gênero de protozoário foi detectado em 58,3% ($n = 14$) meses de amostragem (Tabela 6). As maiores taxas de contaminação ocorreram durante o primeiro ano de monitoramento onde os protozoários foram detectados em 22,2 % das amostras hídricas ($n = 16 / 72$). No segundo ano de monitoramento, observou-se uma diminuição de 50 % nas taxas de contaminação das praias, sendo a presença de protozoários evidenciada em oito das 72 amostras analisadas (11,1 %) (Pranchas 1 e 2).

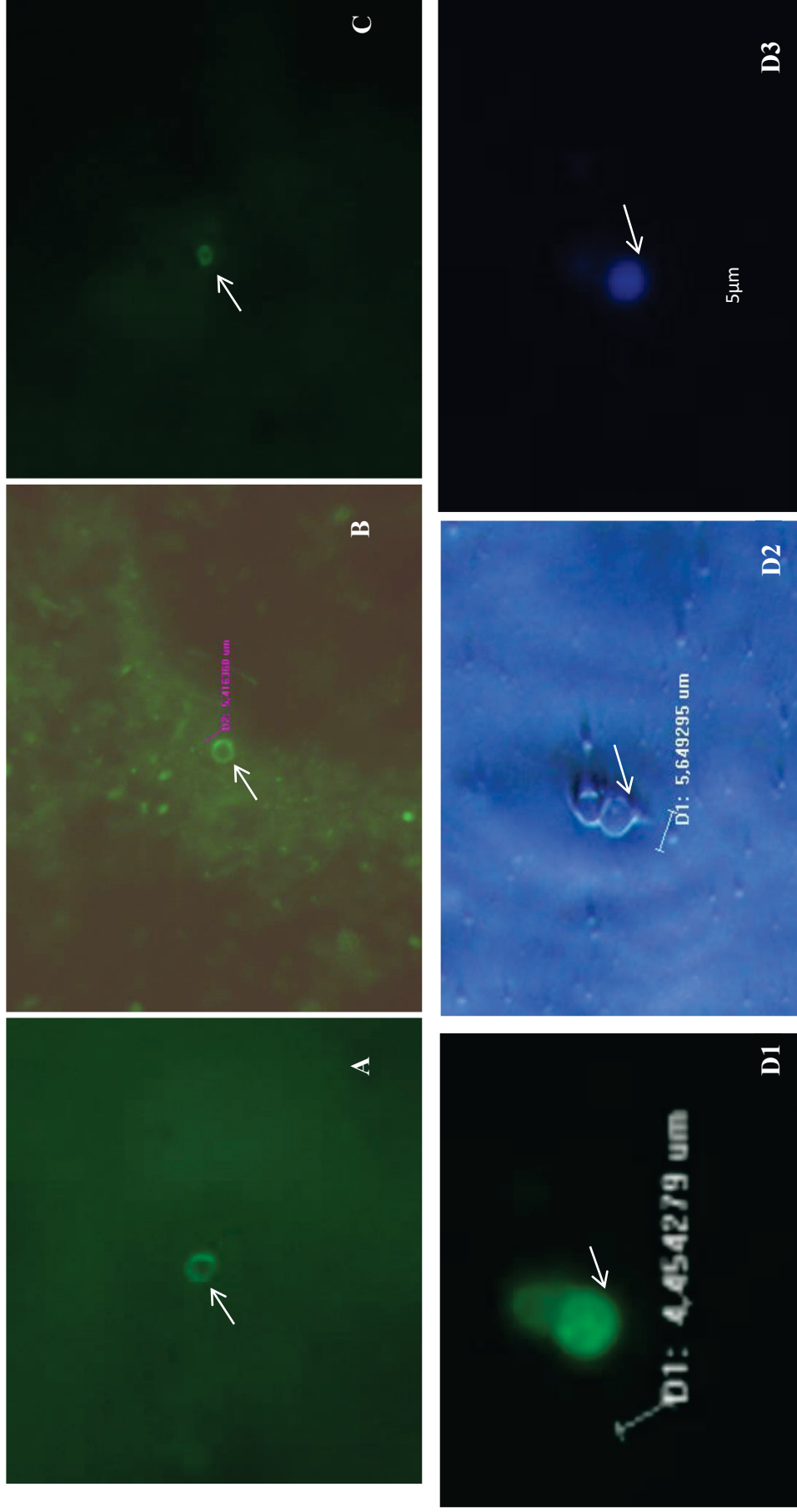
Tabela 6: Ocorrência e concentração de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* por litro nos meses em que se detectou positividade por RID em corpos hídricos que afluem para o mar e em água marinha das três principais praias do litoral paraense durante 24 meses de monitoramento.

Mês / Ano	Ponto 1		Ponto 2		Ponto 3		Ponto 4		Ponto 5		Ponto 6	
	Guaratuba Rio		Guaratuba Mar		Canal de Caiobá		Caiobá Mar		Matinhos Rio		Matinhos Mar	
	Parasito	[] / L	Parasito	[] / L	Parasito	[] / L	Parasito	[] / L	Parasito	[] / L	Parasito	[] / L
ANO 1	Janeiro / 2017	<i>Giardia</i>	64	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	Fevereiro / 2017	ND	-	ND	-	<i>Giardia</i>	40	ND	-	ND	-	ND
	Junho / 2017	ND	-	<i>Giardia</i>	24,4	ND	-	<i>Giardia</i>	29,3	ND	-	ND
				<i>Crypto</i>	24,4							
	Julho / 2017	<i>Giardia</i>	141,8	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	Agosto / 2017	<i>Giardia</i>	32,4	<i>Crypto</i>	60,4	<i>Giardia</i>	94,5	ND	-	<i>Giardia</i>	35,2	<i>Crypto</i>
	Outubro / 2017	<i>Giardia</i>	92	ND	-	ND	-	<i>Giardia</i>	32,9	ND	-	ND
								<i>Crypto</i>	32,9			
	Novembro / 2017	ND	-	<i>Crypto</i>	53,9	ND	-	ND	-	<i>Giardia</i>	99,3	ND
ANO 2	Dezembro / 2017	ND	-	<i>Giardia</i>	50,5	ND	-	<i>Crypto</i>	39,5	ND	-	ND
	Janeiro / 2018	ND	-	ND	-	ND	-	<i>Crypto</i>	26,1	<i>Giardia</i>	50,7	ND
	Fevereiro / 2018	ND	-	ND	-	<i>Crypto</i>	97,5	ND	-	ND	-	ND
	Abril / 2018	<i>Crypto</i>	49,3	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	Junho / 2018	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	<i>Giardia</i>	55,5	ND
	Setembro / 2018	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	<i>Giardia</i>	58,8	ND
	Outubro / 2018	ND	-	ND	-	<i>Giardia</i>	93,5	ND	-	ND	-	<i>Giardia</i>

Legenda: [] / L = Concentração de cistos ou oocistos / L. ND = Não detectado.



Prancha 1: Cistos de *Giardia* spp. detectados em águas de rio e mar em praias do litoral do Paraná em 24 meses de monitoramento.
 Legenda: A = RID; B = DAPI; C = DIC. Aumento: 400 x. Amostras confirmadas também pela amplificação do gene *tpi* para *Giardia duodenalis*.



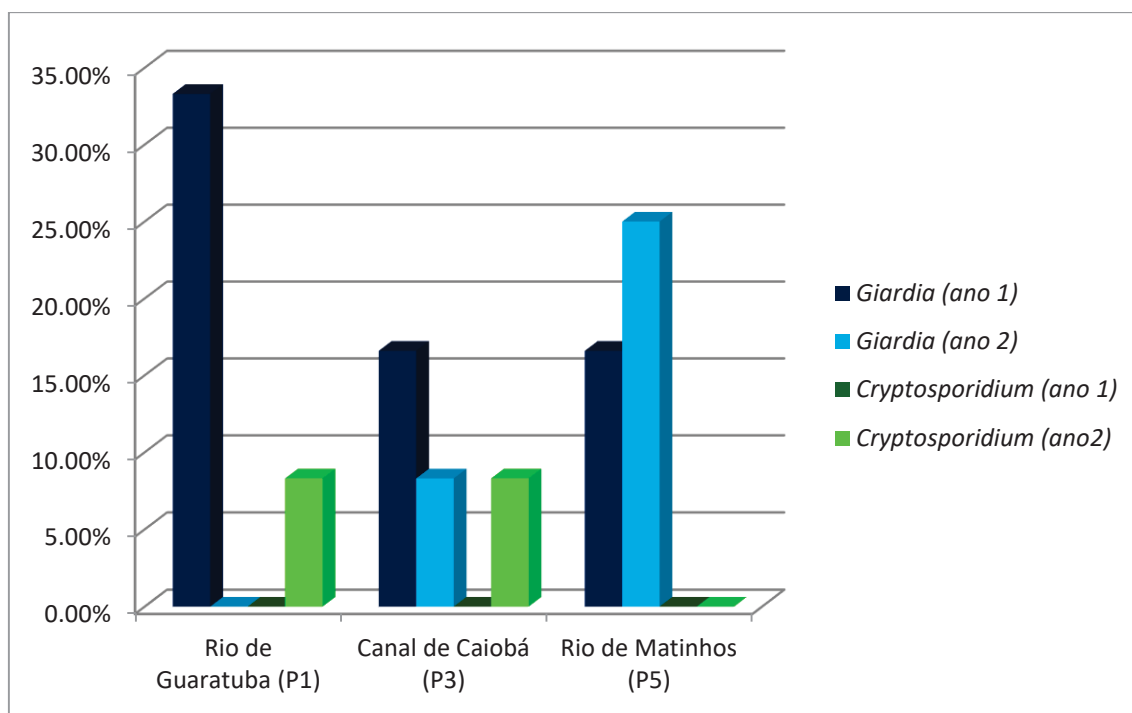
Prancha 2: Oocistos de *Cryptosporidium* spp. detectados em águas de rio e mar em praias do litoral do Paraná em 24 meses de monitoramento. Legenda: A, B e C = RID; D1 = Oocisto aderido à sujudades – RID, D2 = DIC; D3 = DAPI. Aumentos: 200 x e 400 x. Amostras confirmadas também pela amplificação do gene *18S* para *Cryptosporidium*.

Quando considerados os dois anos de monitoramento, 16,6% de todas as amostras apresentaram contaminação por pelo menos um gênero de protozoário ($n = 24 / 144$). Dentre as amostras positivas de água doce e salina, o protozoário do gênero *Giardia* foi detectado com maior frequência - 62,5% ($n = 15 / 24$) (Prancha 1) seguido de oocistos de *Cryptosporidium* em 29,2% ($n = 7 / 24$) (Prancha 2) e, ambos os parasitos foram detectados em 8,3% ($n = 2 / 24$).

Dentre as amostras de corpos hídricos dulcícolas (Pontos 1, 3 e 5) analisadas no primeiro ano de monitoramento (2017), não se detectou contaminação por oocistos de *Cryptosporidium* spp. Entretanto, cistos de *Giardia* spp. foram detectados em todos os corpos hídricos de água doce que desaguam na água do mar das três praias (Figura 6). Entre todos os pontos analisados, a maior contaminação por cistos foi evidenciada no ponto 1 (Rio de Guaratuba) 33,3% (4 / 12 amostras), onde as concentrações variaram de 32,4 a 141,8 cistos / L (Tabela 6) e, média anual de 27,5 cistos.

Para o ponto 3 (Canal de Caiobá), 16,6% das amostras apresentaram contaminação por cistos (2 / 12) variando de 40 a 94,5 cistos / L – concentração média anual de 11,2 cistos do protozoário. Para as amostras de água doce do ponto 5 (Rio de Matinhos) 16,6% das amostras continham cistos (variação de 35,2 a 99,3 cistos / L) (2 / 12) e média anual também de 11,2 cistos de *Giardia*.

Figura 6: Prevalência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em corpos hídricos dulcícolas que afluem para água do mar durante 24 meses de monitoramento.



Ao contrário do primeiro ano de monitoramento, cuja maior taxa de contaminação por cistos de *Giardia* spp. foi detectada no ponto 1 (Rio de Guaratuba), a contaminação pelo protozoário não foi evidenciada em nenhum dos 12 meses de amostragem neste ponto durante o segundo ano (2018) (Tabela 6). Entretanto, oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados nesse ano em 8,3% das amostras (49,3 oocistos / L) (Figura 6).

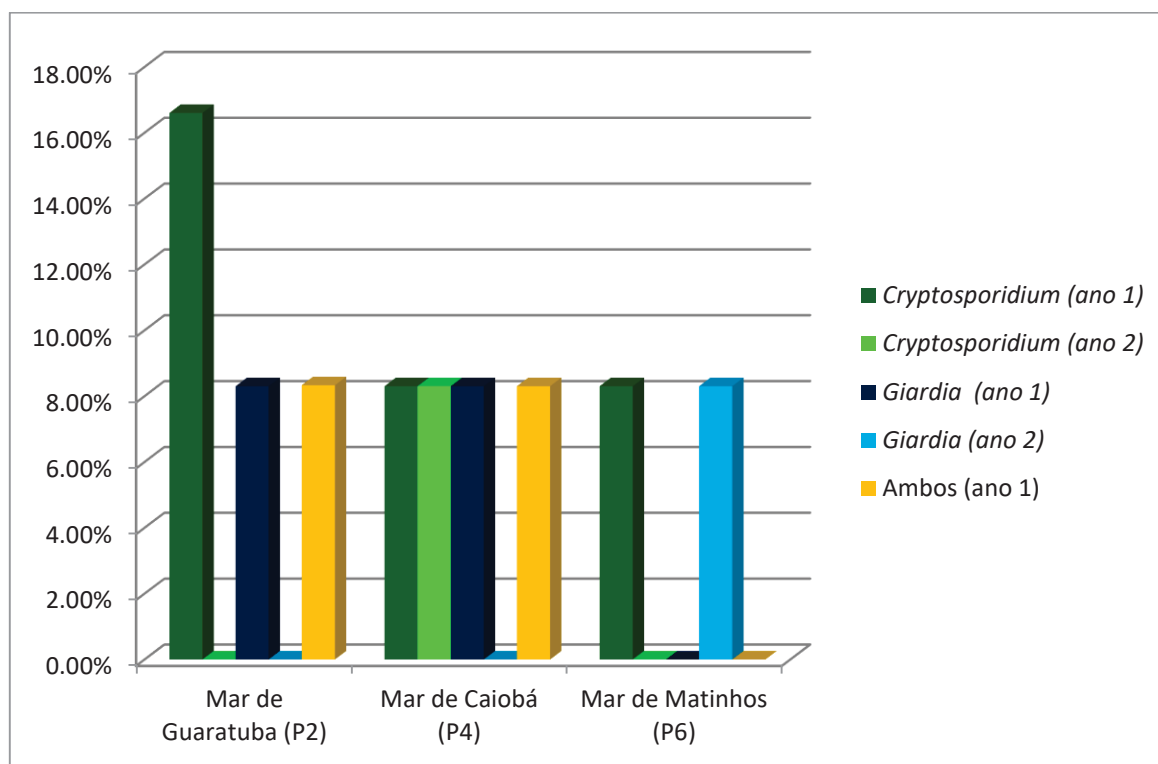
Giardia e *Cryptosporidium* foram detectados nas águas do canal de Caiobá (Ponto 3) no segundo ano de monitoramento em 2 amostras (16,6%) em concentrações de 93,5 e 97,5 cistos e oocistos respectivamente. Desta forma, em ambos os anos evidenciou-se contaminação por cistos e, detecção de oocistos pela primeira vez no ano de 2018 (Figura 6).

O rio de Matinhos apresentou maior contaminação por cistos de *Giardia* spp. no segundo ano de monitoramento: 25,0% (n = 3 amostras) (Tabela 6). A contaminação por oocistos de *Cryptosporidium* spp. não foi detectada nesse ano e, quando considerados os 24 meses de monitoramento de todos os corpos hídricos dulcícolas, este foi o único ponto em que o protozoário não foi identificado.

Dentre as amostras de água do mar no primeiro ano de monitoramento (2017), cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados nos pontos 2 e 4 - Mar de Guaratuba e de Caiobá respectivamente. Para a água do mar da praia de Matinhos, apenas a contaminação por *Cryptosporidium* foi evidenciada neste ano (Figura 7).

Entre todos os pontos de águas salinas (2017), o Mar de Guaratuba (Ponto 2) foi o que apresentou a maior contaminação por *Giardia* e *Cryptosporidium*: 33,3% (n = 4 amostras) (Tabela 6). Deste total, ambos os protozoários foram detectados em 8,3% das amostras de água do mar (n = 1), *Cryptosporidium* spp. em 2 amostras - 16,6% (24,4 a 60,4 oocistos / L, média anual de 11,5 oocistos) e *Giardia* spp. em 1 amostra (8,3%) concentração de 24,4 a 50,5 (média de 6,2 cistos) (Figura 7).

Figura 7: Prevalência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em água do mar durante 24 meses de monitoramento.



O ponto 4 (Mar de Caiobá) exibiu 25% de contaminação ($n = 3$ amostras). Ambos os protozoários foram detectados em 8,3% das amostras ($n = 1$). A contaminação por cistos de *Giardia* foi detectada em 8,3 % (29,3 - 32,9 cistos / L – média de 5,1 cistos, acompanhado de *Cryptosporidium* com mesma proporção de positividade - 8,3% (32,9 – 39,5 média de 6 oocistos).

Na água do mar de Matinhos (Ponto 6) observou-se apenas contaminação por oocistos de *Cryptosporidium* com 8,3% ($n = 1$ amostra) (43 oocistos / L), sendo o ponto de água do mar menos contaminado durante o primeiro ano de monitoramento.

No segundo ano de monitoramento de águas salinas (2018), o ponto 2 (Mar de Guaratuba), ao contrário do primeiro ano, onde foi considerado o ponto com maior impacto de contaminação fecal entre todos os pontos (Figura 7), não se detectou a contaminação por ambos os protozoários.

Cistos de *Giardia* spp. não foram identificados em nenhuma amostra durante o segundo ano de monitoramento da água do mar de Caiobá (P4) e oocistos foram detectados em uma amostra (8,3%). O contrário ocorreu para a água do mar de Matinhos (P6) onde não se detectou a presença de oocistos e, cistos de *Giardia* foram detectados em 8,3% das amostras.

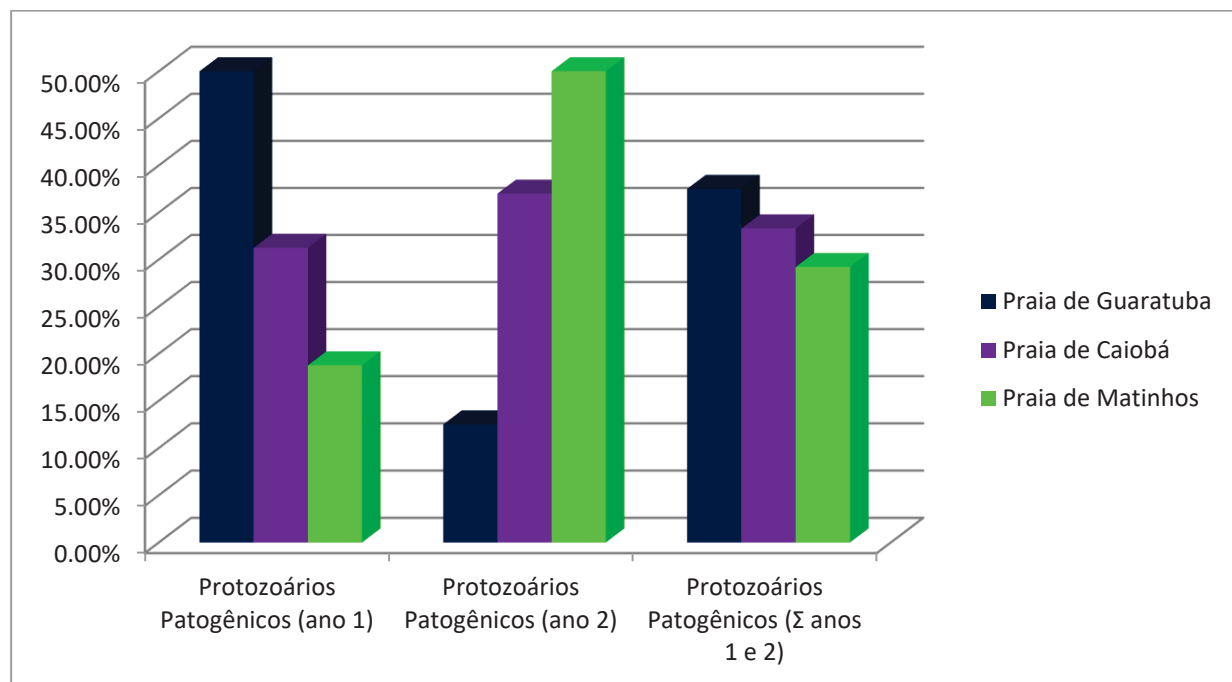
Quando considerados os dois anos de monitoramento da água do mar da praia de Matinhos (P6) observou-se menor impacto de contaminação pelos protozoários estudados nesse local (Figura 7). Entretanto, uma expressiva concentração de cistos de *Giardia* (111,5 / L) foi detectada neste ponto, sendo este o único ponto de água marinha em que se detectou cistos do protozoário no segundo ano de monitoramento (Tabela 6).

Quando comparados os dois anos de monitoramento e a ocorrência de pelo menos um protozoário patogênico, verificou-se que no primeiro ano, um número similar de amostras positivas (22,2%) foi detectado tanto em águas doces como salinas ($n = 8 / 36$) (Tabela 6). No segundo ano, as amostras de corpos hídricos dulcícolas apresentaram-se com contaminação superior – 16,6% ($n = 6 / 36$) quando comparado às de água marinha – 5,5 % ($n = 2 / 36$) (Tabela 6).

Considerando que cada praia é composta por dois biomas aquáticos, os anos de monitoramento, as três praias e o número de amostras positivas, a praia de Guaratuba apresentou as maiores taxas de contaminação por ambos os protozoários patogênicos no primeiro ano de monitoramento com 50% ($n = 8 / 16$) amostras positivas, seguida de Caiobá com 31,2 % ($n = 5 / 16$) e Matinhos com 18,8% ($n = 3 / 16$) (Figura 8).

Para o segundo ano, o inverso foi observado onde Matinhos foi considerada a praia mais contaminada com 50% ($n = 4 / 8$) amostras positivas, seguida de Caiobá com 37,5% de amostras positivas ($n = 3 / 8$) e Guaratuba com 12,5 % ($n = 1 / 8$).

Figura 8: Porcentagem de contaminação por ambos os protozoários patogênicos em três praias do Paraná no primeiro e segundo ano e, na somatória dos 24 meses de análise.



Quando somados os dois anos, a praia de Guaratuba apresentou a maior taxa de contaminação com 37,5% ($n = 9 / 24$) amostras positivas, seguida de Caiobá com 33,3% ($n = 8 / 24$) e Matinhos com 29,2% ($n = 7 / 24$) (Figura 8).

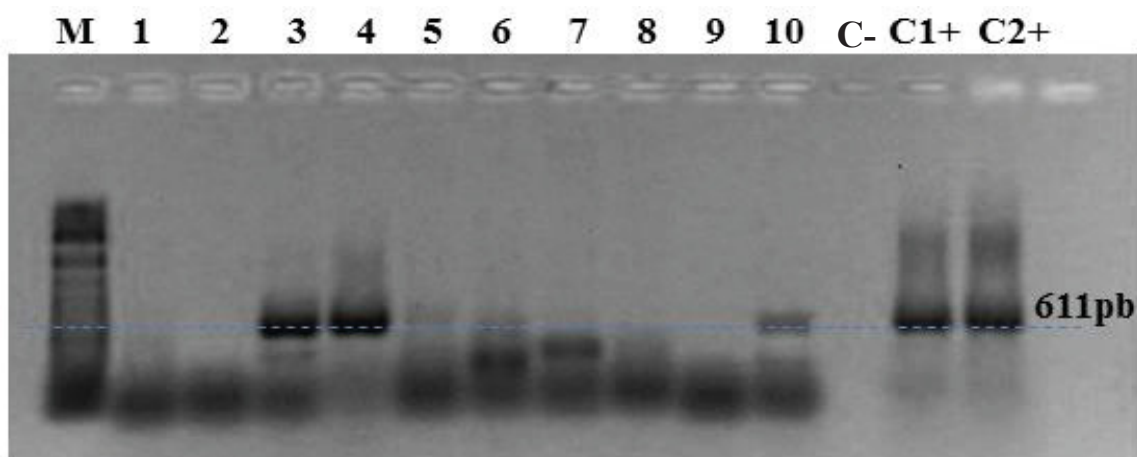
5.2 Caracterização molecular

5.2.1 *Cryptosporidium* spp.

Foram detectadas por RID, 9 amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. em dois anos de monitoramento, sendo que 44,4% (4 / 9) foram confirmadas mediante amplificação de fragmentos específicos do gene *18S*.

As reações de PCR utilizando iniciadores de Xiao e colaboradores (1999) apresentaram resultado negativo. Entretanto, para as reações de PCR utilizando iniciadores de Silva et al., 2013 para amplificação de fragmento equivalente a 611 pb obteve-se resultado positivo para 4 amostras (Pontos de Rio de Guaratuba, mar de Guaratuba e duas amostras positivas no ponto de mar de Caiobá) (Figuras 9)

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 1, 5% corado com GelRed® (Biotium). Resultados obtidos após a realização da *nPCR* para detecção do fragmento de 611pb de *Cryptosporidium*. Coluna 3: Mar de Guaratuba (Junho de 2017); coluna 4: Rio de Guaratuba (abril de 2018); coluna 10: Mar de Caiobá (Outubro de 2017); (M): Marcador - DNA *ladder* de 100pb. Controle negativo e controle positivo (C+) da reação.



Dentre as amostras positivas e sequenciadas para o gene *18S rRNA* apenas a amostra 4 apresentou sequências utilizáveis, sendo estas alinhadas e submetidas ao sistema BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool) para comparação com sequências homólogas disponíveis de *Cryptosporidium* no banco de dados GenBank. Após avaliação dos resultados esta amostra resultou perfil compatível com a sequência MT416399.1 de *Cryptosporidium* spp. depositada no banco de dados.

5.2.2 *Giardia* spp.

Ao todo, 17 amostras foram positivas para *Giardia* em 24 meses de monitoramento, mediante confirmação por Reação de Imunofluorescência Direta. Do total de amostras positivas, confirmou-se a contaminação por *Giardia duodenalis* em 3 amostras (17,7%) mediante amplificação do gene TPI (triosefosfato isomerase) por PCR.

A contaminação por *Giardia duodenalis* foi evidenciada nos pontos 1, 2 e 3 correspondentes aos pontos de Rio de Guaratuba, mar de Guaratuba e Canal de Caiobá respectivamente. Após a realização do sequenciamento dos produtos de PCR das amostras consideradas positivas para o gene TPI, os picos gerados no eletroferograma apresentaram má qualidade, portanto não foi possível realizar a caracterização genotípica dessas amostras.

5.3 Resultados Microbiológicos

De modo geral, todas as praias apresentaram importante contaminação por indicadores bacteriológicos de contaminação fecal durante os dois anos de monitoramento. Em todos os pontos referentes aos corpos hídricos – rios e canais (pontos 1, 3 e 5) a média anual de concentração de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. foi excessivamente superior à concentração encontrada nas águas marinhas (pontos 2, 4 e 6) (Tabela 7).

Para os pontos de água doce, o Rio de Matinhos (P3) apresentou-se como o menos contaminado no primeiro ano de monitoramento, quando considerados os valores mínimos, máximos e média anual de contaminação por *Escherichia coli*, seguido do Canal de Caiobá e, o Rio de Guaratuba, considerado o mais impactado no presente estudo. As análises de contaminação por *Enterococcus* sp. demonstraram que o Rio de Matinhos apresentou as maiores taxas de contaminação, seguido do Rio de Guaratuba e canal de Caiobá. Para o segundo ano, o canal de Caiobá apresentou maior impacto de contaminação fecal quando considerada a média anual de concentração de *Escherichia coli* e, o rio de Guaratuba, os piores índices de contaminação de acordo com média anual de *Enterococcus* sp., embora a média anual para este indicador em todos os pontos foi similar: 8.0×10^3 .

A água do mar das praias de Caiobá e Matinhos apresentou a pior qualidade sanitária quando considerada a média anual de *Escherichia coli* e de *Enterococcus* sp. durante o primeiro ano de monitoramento. Já para o segundo ano, a qualidade microbiológica de todos os pontos de água do mar apresentou melhoria em relação ao primeiro ano, quando considerados ambos os indicadores analisados neste estudo (Tabela 7).

Tabela 7: Contaminação por bactérias indicadoras de contaminação fecal expressos em NMP / 100 mL: valores mínimos, máximos e médias para cada ponto referente ao ano de 2017 e 2018.

Enterococcus spp.							
		Min.	Máx.	Média	Min.	Máx.	Média
Ano 1	Rio de Guaratuba	170	350.000	56.670	330	170.000	28.448
	Mar de Guaratuba	93	3.300	964	20	23.000	2.988
	Canal de Caiobá	1700	170.000	37.609	1100	79.000	20.727
	Mar de Caiobá	20	22.000	6.766	20	49.000	5.343
	Rio de Matinhos	170	130.000	22.664	18	230.000	31.693
	Mar de Matinhos	<18	23.000	3.053	18	79.000	10.917
	Rio de Guaratuba	820	46.000	12.997	1.600	33.000	8.504
	Mar de Guaratuba	<2	1.700	425	18	1.400	426
	Canal de Caiobá	520	170.000	27.646	540	28.000	8.064
	Mar de Caiobá	<2	1.733	464	<1	460	85
Ano 2	Rio de Matinhos	9,8	33.000	11.535	130	22.000	8.180
	Mar de Matinhos	<2	1.700	399	1,8	490	270

5.3.1 Correlação entre bactérias e protozoários parasitos.

Para nenhum dos pontos de água doce e água do mar foi verificada correlação entre contaminação por bactérias indicadoras e presença de protozoários durante os dois anos de monitoramento ($p > 0,05$).

Quando considerado conjuntamente cada ponto monitorado e a detecção de parasitos e bactérias, verificou-se maior concentração de indicadores bacteriológicos nos pontos de águas doces, (1, 3 e 5) nos meses em que foram detectados protozoários patogênicos nos dois anos de monitoramento (Tabela 8).

O contrário foi observado nos pontos de águas marinhas (2, 4 e 6) onde a concentração de bactérias foi menor nos meses em que protozoários patogênicos foram detectados. As concentrações de *E. coli* foram elevadas na maioria dos pontos de rio, entretanto observou-se que no ponto de Rio de Guaratuba - mês de julho de 2017 – detectou-se a maior concentração de cistos de *Giardia* spp. (141,8 cistos/L) de todo o período de estudo e, menor concentração de *Escherichia coli* nesse mês, quando comparados a outros meses em que se detectou positividade para parasitos e diferentes concentrações de bactérias nesse ponto (Tabela 8).

Esta situação também foi verificada em alguns meses de amostragem na praia de Matinhos, durante o primeiro e segundo ano de monitoramento, onde oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados na água do mar (Agosto / 2017) com baixos índices de contaminação para ambos os indicadores. Além disso, a maior contaminação por cistos de *Giardia* verificada em água do mar no segundo ano de monitoramento, também foi detectada nesse mesmo ponto (Outubro / 2018) onde a contaminação por *Enterococcus* sp. foi aferida em baixíssima concentração.

Tabela 8: Concentração de indicadores e valores de parâmetros físico-químicos nos meses em que se detectou a presença de protozoários

Praia	Mês/Ano	Ponto	<i>E. coli</i>	Enterococos	(oo)cistos / L	T (°C)	Turbidez (NTU)	Salinidade (‰)	pH
Guaratuba	Jan/17	Rio	130.000	79.000	64 cistos	27.0	2,70	0	6,97
	Jul/17	Rio	170	2.300	141,8 cistos	24.0	9,42	0,3	7,30
	Ago/17	Rio	13.000	2.200	32,4 cistos	25,7	5,0	0,3	6,63
	Out/17	Rio	NR	NR	92 cistos ⁺	22,0	NR	NR	NR
	Abr/18	Rio	3.300	3.300	49,3 oocistos ⁺⁺	26,0	NR	NR	7,30
	Jun/17	Mar	170	170	24,4 cistos ⁺ / oocistos ⁺⁺	22,9	5,2	29,7	7,75
	Ago/17	Mar	93	78	60,4 oocistos	23,7	24,0	32,6	8,10
	Nov/17	Mar	130	<180	53,9 oocistos	29,0	11,1	32,3	8,0
	Dez/17	Mar	130	<180	50,5 cistos	22,8	33,2	33,2	8,10
	Fev/17	Canal	170.000	33.000	40 cistos	24,7	6,0	0	6,70
Caiobá	Ago/17	Canal	13.000	33.000	94,5 cistos ⁺	24,7	5,79	0	6,75
	Fev/18	Canal	23.000	6.300	97,5 oocistos	26,0	10,7	0	6,80
	Out/18	Canal	960	3.500	93,5 cistos	24,0	2,86	0	7,80
	Jun/17	Mar	330	180	29,3 cistos	22,8	5,0	29,4	7,62
	Out/17	Mar	NR	NR	32,9 cistos / oocistos ⁺⁺	23,0	NR	NR	NR
	Dez/17	Mar	<180	400	39,5 oocistos ⁺⁺	25,4	13,2	31,1	8,10
	Jan/18	Mar	NR	NR	26,1 oocistos	29,0	NR	NR	NR
	Ago/17	Rio	13.000	2200	35,2 cistos	24,4	5,0	0	6,63
Matinhos	Nov/17	Rio	4.900	13.000	99,3 cistos	32,0	6,66	5,7	6,87
	Jan/18	Rio	NR	NR	50,7 cistos	28,0	NR	NR	NR
	Jun/18	Rio	NR	NR	55,5 cistos	20,0	11,8	40	7,97
	Set/18	Rio	9,8	2.400	58,8 cistos	23,0	4,15	8	7,76
	Ago/17	Mar	<18	<18	43 oocistos	23,6	7,10	32,5	8,20
	Out/18	Mar	328	1,8	111,5 cistos/L	24,7	5,64	27,0	6,64

Nota: NR = Não realizado; ⁺ Amplificação positiva para *Giardia*: gene *tpi*; ⁺⁺ Amplificação positiva para *Cryptosporidium*: gene *18S*.

5.4 Monitoramento de parâmetros físico-químicos

Os valores de pH, temperatura, turbidez e salinidade, aferidos no momento de cada coleta, tanto na água do mar quanto nas amostras de água de rio das diferentes praias, foram monitorados por 24 meses, sendo as médias de cada parâmetro calculada e comparada entre os pontos (Tabela 9). Também são apresentados os dados para cada parâmetro nos meses em que se detectou positividade para protozoários (Tabela 8).

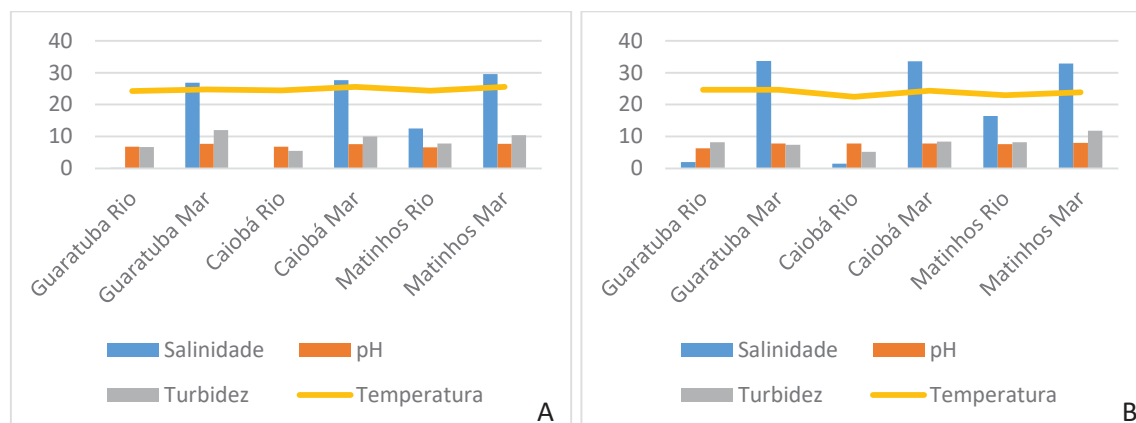
Tabela 9: Médias obtidas de diferentes parâmetros físico-químicos monitorados mensalmente nos ambientes aquáticos e marinhos das principais praias do litoral do Paraná durante 24 meses.

Ano 1	GR	GM	CR	CM	MR	MM
pH*	6,82	7,75	6,85	7,62	6,62	7,69
Temperatura	24,3	24,7	24,4	25,6	25,4	25,5
Turbidez	6,68	12	5,53	9,99	7,79	10,4
Salinidade	0,2	26,8	0,03	27,7	12,5	29,6
Ano 2	GR	GM	CR	CM	MR	MM
pH*	6,28	7,82	7,79	7,83	7,66	8,02
Temperatura	24,6	24,6	22,4	24,3	22,9	23,8
Turbidez	8,17	7,38	5,25	8,37	8,18	11,8
Salinidade	2,02	33,7	1,52	33,5	16,4	32,9

Legenda: GR: Rio de Guaratuba; GM: Mar de Guaratuba; CR: Canal de Caiobá; CM: Mar de Caiobá; MR: Rio de Matinhos; MM: Mar de Matinhos. Unidades: Temperatura - °C; Turbidez - NTU; Salinidade - ppm

Para a temperatura, os valores obtidos nas amostras de águas doces foram um pouco inferiores aos de água do mar durante os dois anos (Figura 10).

Figura 10: Comparação entre as médias obtidas de parâmetros físico-químicos de ambientes dulcícolas e salinos das principais praias paranaenses em 24 meses de monitoramento. A: ano de 2017 e B: ano de 2018.



Não houve correlação entre temperatura e protozoários patogênicos para cinco dos seis pontos de água analisados em cada ano separadamente. Para o ponto de Rio de Matinhos (P5) uma correlação positiva foi verificada entre temperatura e protozoários ($p = 0,02$, $r = 0,62$) no ano de 2017.

As águas doces apresentaram pH mais ácido em relação à água do mar dos três pontos de monitoramento em médias anuais. O único ponto que apresentou média anual de pH básico foi o de Mar de Matinhos (P6) no segundo ano de monitoramento, sendo todos os outros, considerados neutros em ambos os anos de monitoramento (Tabela 9). Não houve correlação entre pH e protozoários patogênicos ($p > 0,05$).

Quanto às médias de turbidez para os pontos de águas doces, registraram-se valores menores aos de água do mar em 2017. Para o ano de 2018, apenas o ponto de água do Rio de Guaratuba obteve média superior ao ponto de Mar de Guaratuba (Tabela 9) (Figura 10). Uma correlação positiva entre turbidez e protozoários foi verificada

apenas para o ponto 2 (mar de Guaratuba) durante o ano de 2017, ($p = 0,011$, $r = 0,699$) considerado o ponto com maior média anual.

O ponto de Matinhos Rio (P5) foi o único que apresentou médias anuais mais elevadas de salinidade (Figura 10). Ao realizar a correlação de Pearson entre salinidade e detecção de protozoários pôde-se observar que não houve correlação.

O teste de correlação de Pearson também foi realizado entre todos os parâmetros físico-químicos e protozoários, para aferir se houve efeito da sazonalidade por estação do ano para cada ponto durante os dois anos. A turbidez e a temperatura foram os parâmetros mais importantes correlacionados com a presença de protozoários patogênicos em diferentes biomas aquáticos e estações do ano durante os dois anos. Foi observada uma forte correlação positiva no ponto de mar de Guaratuba entre a presença de protozoários e turbidez tanto no inverno como na primavera ($r = 0,9$ e $r = 0,7$) respectivamente, $p < 0,05$ para ambos. Para este mesmo ponto, durante a primavera verificou-se forte correlação positiva entre protozoários e pH ($r = 0,92$).

No ponto do Canal de Caiobá no verão foi verificada forte correlação positiva entre protozoários e temperatura ($r = 0,9$; $p < 0,05$). Na estação de Inverno, verificou-se correlação positiva entre protozoários e turbidez ($r = 0,91$) e correlação negativa entre pH e protozoários ($r = -0,93$). No ponto de mar de Caiobá na primavera houve forte correlação positiva entre protozoários e pH ($r = 0,86$; $p > 0,05$) e para o outono, foi observada significância ($p < 0,05$) em relação a protozoários e salinidade, porém, com fraca correlação ($r = 0,011$), e significância entre protozoários e temperatura ($p < 0,05$), também com fraca correlação ($r = -0,16$). Para o mar de Matinhos na primavera foi verificada correlação negativa entre protozoários e pH ($r = -0,80$) e salinidade ($r = -0,91$), porém sem diferenças significativas ($p > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A atividade antrópica tem contribuído sistematicamente com a contaminação de ambientes aquáticos, especialmente em corpos hídricos de água doce que afluem para estuários e demais áreas costeiras (Ruiz et al., 2005). O despejo de esgoto doméstico *in natura* ou mesmo tratado destaca-se mundialmente como a principal fonte de contaminação destes ambientes (Johnson et al., 1995; Fayer e Lindsay, 2004; Leal et al., 2013, 2018a; Bautista et al., 2018; Razzolini et al., 2020).

O presente estudo representa o primeiro relato da contaminação por protozoários patogênicos em praias destinadas à recreação humana no Estado do Paraná. Em adição, este é o primeiro estudo a realizar o monitoramento simultâneo de cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp., *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. em biomas diferentes (água doce, salobra e salina) que compõe áreas costeiras por um período superior há um ano no Brasil.

Em 24 meses de monitoramento de três praias do Paraná, a contaminação por cistos de *Giardia* ou oocistos de *Cryptosporidium* foi confirmada em 58,3% dos meses de amostragem (14 / 24), denotando má qualidade sanitária destas áreas recreacionais. A análise de corpos hídricos que afluem para as diferentes praias revelou importante impacto de contaminação fecal e contribuição contínua dos rios e canais para a alteração da qualidade da água do mar, tanto mediante enumeração de concentração de bactérias indicadoras quanto pela detecção frequente de protozoários patogênicos.

De fato, o escoamento urbano e a drenagem hídrica de sedimentos são responsáveis pela introdução de não somente contaminantes biológicos para corpos hídricos, mas também de uma variedade de compostos toxicológicos (Cross et al., 1990; Dwight et al., 2002; Souza et al., 2012). Em uma ampla investigação de contaminantes

conduzida nos maiores rios do sul da Califórnia, Estados Unidos, verificou-se que o volume de vazão dos rios esteve significativamente associado aos níveis de concentração de todos os parâmetros analisados na pesquisa. Em adição, uma das constatações significativas do referido estudo foi a indicação de que, quanto maior o volume do fluxo de rios, maior a carga poluente transferida para a zona costeira (Cross et al., 1990).

A importância de corpos hídricos dulcícolas como carreadores de protozoários encistados para água do mar das praias paranaenses foi evidenciada em diferentes meses e em ambos os anos de monitoramento. Esta contribuição tornou-se ainda mais evidente quando considera-se o segundo ano de monitoramento, visto que entre as amostras positivas de ambos os biomas em 2018 ($n = 8$) os protozoários foram detectados em água doce em seis delas.

Do mesmo modo, isto foi constatado para a carga microbiana, onde uma concentração excessivamente maior para *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. foi verificada nos biomas dulcícolas em relação aos biomas salinos, em ambos os anos de monitoramento. Quando comparada a média anual de concentração de *Escherichia coli* no ponto 1 (Rio de Guaratuba) que se apresentou como o bioma mais contaminado de água doce no primeiro ano de monitoramento, a concentração do indicador foi 59 vezes superior à encontrada na água do mar da praia de Guaratuba e, a concentração de enterococos, aproximadamente 9,5 vezes maior.

Para o segundo ano de monitoramento, o canal de Caiobá apresentou os piores índices sanitários, quando considerada a média anual de ambos os indicadores avaliados, podendo representar um aumento do risco de aquisição de doenças gastrointestinais, de pele ou oftálmicas para os banhistas e nadadores que frequentam

esta praia. A concentração de *Escherichia coli* foi aproximadamente 60 vezes superior à densidade média anual de organismos aferida na água do mar. Para *Enterococcus* sp. a média anual verificada no canal, mostrou-se aproximadamente 95 vezes maior que a encontrada na água do mar da praia de Caiobá.

Naturalmente, ocorre um efeito de diluição da água do rio ao adentrar o ambiente marinho. Diversos componentes presentes na água podem afetar a presença de microrganismos e as concentrações podem variar em função de alguns fatores físico-químicos, especialmente a salinidade, pois a ausência ou baixo índice desse parâmetro contribui para a proliferação das comunidades bacterianas presentes nestes cursos de água (Ortega et al., 2009; Paulino et al., 2020).

Além disso, as condições de maré e dos ventos também podem influenciar a dispersão e concentração de bactérias e organismos patogênicos, alterando inclusive a movimentação de esgotos despejados nas praias ampliando a extensão da contaminação (Berg et al., 2013). Esta situação foi verificada no presente estudo, para todos os pontos de água doce que apresentaram pequenas concentrações de salinidade e, elevada concentração de indicadores fecais, com exceção do ponto de Rio de Matinhos, o único bioma a apresentar valores mais elevados de salinidade.

Este é o mais extenso dos biomas de água doce monitorados neste estudo e também, o que apresenta a maior vazão, e, o que recebe de forma constante forte influência de marés de enchente, por conta da desembocadura do rio ser aberta, característica não apresentada pelos outros pontos. Desta forma, menores concentrações de indicadores poderiam ser esperadas para este ponto, no entanto, não foi observada diminuição da densidade bacteriana. Inclusive, este ponto foi o único a apresentar

concentração média anual de *Enterococcus* superior à *Escherichia coli* durante o primeiro ano de monitoramento.

De acordo com a Resolução nº 357 / 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), os pontos 1 e 3 (Rio de Guaratuba e canal Caiobá) são considerados corpos de água doce por apresentar salinidade inferior a 0,5 ‰. Já para o ponto 5 (Rio de Matinhos), apesar de se apresentar como um corpo hídrico de água doce antes de desembocar no mar, quando aflui para área costeira, foi considerado um ambiente de água salobra ou salina na maioria dos meses no presente estudo, por apresentar águas com salinidade superior a 0,5 ‰ e inferior a 30 ‰ ou superior a 30 ‰ respectivamente.

Muitos dos fatores abióticos podem ser nocivos a bactérias utilizadas como parâmetros indicadores, tais como sensibilidade à radiação solar (raios UV) e altas concentrações de salinidade, sendo estas, removidas mais rapidamente do ambiente quando comparada à resistência e longevidade de *Cryptosporidium* e *Giardia* (Chauret et al., 1995; Tamburrini e Pozio, 1999).

O biofilme presente em águas costeiras e em ambientes como de costão rochoso, também propicia proteção para os protozoários contra raios ultravioletas; oocistos de *Cryptosporidium parvum* expostos à radiação solar tiveram diminuição quanto à infectividade em detrimento aos que foram abrigados da radiação pelo biofilme, mensurada mediante cultivo celular e infecção de células de adenocarcinoma ileocecal humano (HCT-8), sugerindo que o biofilme fornece uma barreira protetora para oocistos contra a radiação solar (DiCesare et al., 2012). Recentemente, Masangkay et al. (2020) demonstraram mais uma associação entre protozoários e biofilmes, ao

isolar oocistos de *C. hominis* dessas estruturas e de poríferos filtradores associados a substratos presentes em ambientes aquáticos.

Em um estudo conduzido por Bravim e colaboradores (2004), observou-se que colônias de *E. coli* decresceram em contato com radiação solar e, enterococos sobreviveram maior tempo, sendo destruídos somente após 2 a 4 dias em altas concentrações salinas. A capacidade dos enterococos em sobreviver mais tempo em condições salinas de até 6,5% (Brasil, 2000; Paradella et al., 2007) pode explicar as maiores concentrações deste gênero de bactéria no ponto de Matinhos em relação aos demais corpos hídricos (águas doces) que afluem para as demais praias, observado especialmente no primeiro ano de monitoramento.

De fato, para o primeiro ano de monitoramento evidenciou-se os menores valores de salinidade, onde para o Rio de Guaratuba e Canal de Caiobá, sete e nove amostras respectivamente, apresentaram percentual de salinidade igual a zero e para o Rio de Matinhos, o percentual de salinidade variou de 0,51 a 33,6, e seis amostras apresentaram valores abaixo do percentual de salinidade máximo tolerado para o crescimento da bactéria (0,51 a 5,7).

Outros estudos também demonstraram a mesma relação evidenciada no presente estudo, entre pequenas taxas de salinidade e altas concentrações de indicadores de contaminação fecal. Em ambientes de água doce e estuários subtropicais da costa da Flórida e da Califórnia, Estados Unidos, o pequeno percentual de salinidade esteve significativamente associado à detecção frequente de indicadores (He et al., 2007; Ortega et al., 2009).

A legislação brasileira supracitada também indica padrões de qualidade para águas doces destinadas a recreação, sendo que para a balneabilidade, obedece à mesma legislação para águas marinhas do CONAMA (274 / 2000), que preconiza a pesquisa de

coliformes termotolerantes como parâmetro, onde em 80% de um conjunto de seis amostras não deve apresentar concentração superior a 1.000 NMP / 100 mL. A legislação também indica a pesquisa de *E. coli* como parâmetro de substituição onde as concentrações devem ser determinadas pelo órgão ambiental competente da região (Brasil 2005).

No Paraná, o IAP regulamenta essas diretrizes no estado, e estabelece que em 80% ou mais de um conjunto de cinco amostras, a concentração satisfatória para *E.coli* deve ser inferior a 800 NMP /100 mL (Brasil, 2000). Desta forma, quando considerados os resultados para este indicador, os rios que afluem para as praias do Paraná foram considerados como impróprios para banho durante os dois anos de monitoramento. Apesar dos banhistas que frequentam as praias do Paraná não utilizarem comumente estas áreas para este fim, estas são responsáveis por importante alteração e introdução de bactérias e protozoários patogênicos para a água do mar, amplamente utilizada para recreação tanto pela população autóctone como de turistas.

Ressalta-se que este estudo apresenta outra importante contribuição para o órgão ambiental governamental estadual, por fornecer dados inexistentes especialmente para protozoários e, da contaminação por bactérias indicadoras durante todo o ano, contemplando o outono, inverno e primavera. O órgão supracitado somente realiza a pesquisa de indicadores na época de maior fluxo de veranistas.

Nadar próximo a pontos que recebem o escoamento não tratado de drenos pluviais e efluentes brutos carregado para águas costeiras por corpos hídricos dulcícolas representa maior probabilidade de aquisição de doenças de etiologias diversas, como constatado por Haile et al., 1999. Ao realizar um estudo de investigação epidemiológica na Baía de Santa Mônica, California EUA, os autores constataram que indivíduos que

nadavam próximo a estes pontos apresentaram 50% mais propensão de desenvolver sintomas respiratórios ou gastrointestinais do que os indivíduos que nadavam a 370 m de distância dos pontos impactados.

É importante mencionar que a maior parte dos estudos que realizaram avaliação de patógenos em áreas costeiras recreacionais se refere aos riscos oriundos de contaminação por bactérias patogênicas e indicadoras, sendo a contaminação por protozoários parasitos iniciada em meados da década de 90 em escala mundial (Johnson et al., 1995; Wyer, et al., 2012). Entretanto, quando se considera a dose infectante e se aventa a possibilidade de ingestão acidental de patógenos, tanto em águas balneáveis como não balneáveis, a dose infectante para o estabelecimento de infecção por enterobactérias é elevada, variando de 10^5 a 10^{10} organismos (OMS, 2003), enquanto que para *Giardia* e *Cryptosporidium*, a ingestão de apenas 10 cistos ou oocistos já é suficiente para o início da infecção parasitária (Rose et al., 1991; Okhuysen et al., 1999).

Em ambos os anos, a presença de cistos de *Giardia* sobrepujou a contaminação por oocistos de *Cryptosporidium* – não detectados durante todo o primeiro ano de monitoramento – nos rios de Guaratuba e Matinhos e Canal de Caiobá do presente estudo. Entre todos os pontos de água doce, as maiores taxas de contaminação por cistos de *Giardia* spp. foram evidenciadas no Rio de Guaratuba durante o primeiro ano de monitoramento, entretanto, não foram detectados em nenhum mês do segundo período do estudo. O parasito foi detectado em ambos os anos no Canal de Caiobá e Rio de Matinhos inclusive, para este último, com aumento das taxas de contaminação do primeiro para o segundo ano de monitoramento.

Este fato também foi verificado em uma área costeira do sudeste brasileiro em uma praia do litoral norte do Estado de São Paulo, onde cistos de *Giardia* spp. foram detectados em número de meses muito superior a oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água doce de rio que afluía para água do mar (Leal, 2008). Durante 12 meses de monitoramento, cistos de *Giardia* foram identificados em 66,6% das amostras de água de rio (n = 8 meses) em concentrações que variaram de 30,7 a 184,6 cistos / L e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em apenas 8,3% das amostras (n = 1) (76,9 oocistos / L).

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* em corpos hídricos que afluem para água do mar do presente estudo, também foi detectada em igual proporção ao estudo supracitado: 8,3% das amostras de água doce monitoradas no segundo ano apresentaram contaminação pelo protozoário em Guaratuba e Caiobá, sendo a concentração de oocistos identificada no canal de Caiobá (97,5 / L) superior ao estudo conduzido no sudeste.

Giardia spp., está amplamente dispersa em mananciais e outros corpos hídricos de água doce no Brasil, sendo a protozoose considerada endêmica no país (Coelho et al., 2017). O Brasil lidera o número de investigações acerca da contaminação de amostras ambientais hídricas por protozoários na América Latina, entretanto, quando comparado aos inquéritos epidemiológicos e investigações de surtos conduzidos especialmente em países desenvolvidos, este tipo de análise no país - iniciado a partir do ano 2000 - ainda é considerado incipiente e com disparidades entre as regiões do país (Franco, et al., 2012; Coelho et al., 2017; Rosado-García et al., 2017).

Em mananciais do Estado de São Paulo, como o Rio Atibaia – situado na cidade de Campinas, a contaminação por cistos de *Giardia* spp. esteve presente em 100% das amostras analisadas em concentrações variando de 33 a 95 cistos / L (Franco et al.,

2001). A contaminação por cistos de *Giardia* também já foi evidenciada em águas superficiais do Estado do Paraná nas cidades de Maringá e Londrina, sendo detectados em 19,9% e 8,3% dos mananciais utilizados para captação e tratamento de água destinada ao consumo humano, respectivamente (Nishi et al., 2009; Almeida et al., 2015). Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados somente na água bruta localizada na cidade de Maringá.

A contaminação por ambos os protozoários patogênicos em águas de rios superficiais utilizados como fonte de captação de água por estações de tratamento, também foi verificada recentemente em outra importante região turística do oeste do estado do Paraná, na cidade de Foz do Iguaçu (Scherer, 2019), porém, em concentrações inferiores às evidenciadas nos rios que atravessam as cidades litorâneas do estado e desembocam nas águas marinhas do presente estudo.

Do total de amostras de águas brutas examinadas em Foz do Iguaçu, cistos de *Giardia* spp. ou oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados em 33,0%. Nas águas do Rio Tamanduá, onde somente evidenciou-se contaminação por cistos de *Giardia* (concentração de 9 – 11 cistos / L) e, oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em concentrações de 8,5 a 9 / L nas águas do Rio Paraná (Leal et al., 2018b).

De acordo com Rosado-García et al. 2017 e Coelho et al. 2017 no Brasil, a técnica de filtração em membranas é a mais amplamente empregada para concentração das formas parasitárias em amostras hídricas, seguida da visualização por reação de imunofluorescência direta dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* spp. Esta metodologia de detecção seguida da referida reação imunológica, também foi empregada para o isolamento e confirmação da contaminação por ambos os protozoários no presente estudo tanto em água doce como em água do mar e, em todos

os demais estudos supramencionados em águas superficiais nos estados de São Paulo e Paraná.

A concentração de cistos e oocistos em membranas apresenta menor custo e facilidade de execução, quando comparada a outras técnicas de concentração como a floculação em carbonato de cálcio, filtração em cartuchos ou pelo sistema Filta-Max, entretanto, a principal desvantagem da metodologia, consiste na necessidade de troca frequente das membranas devido à obstrução mais rápida dos poros, sendo diretamente dependente da turbidez, mensurada em unidade nefelométrica de turbidez (NTU) de diferentes corpos hídricos (Franco et al., 2012).

A técnica de diagnóstico escolhida para confirmação da contaminação por ambos os protozoários, mediante visualização por reação de imunofluorescência direta nas amostras de água de rio e mar das praias paranaenses, é considerada o padrão ouro pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2012).

Em extensão, diversos países desenvolvidos reportaram a presença destes protozoários em águas dulcícolas (Karanis et al., 2007; Efstratiou et al., 2017; Rosado-García et al., 2017, Mahmoudi et al., 2017). Quando se considera os surtos de veiculação hídrica por ambos os protozoários patogênicos no período de 2011 a 2016, a contaminação de águas de rios ou córregos foi a fonte de origem de alguns deles - a maioria nos Estados Unidos - e também na Alemanha e Bélgica (Efstratiou et al., 2017). No continente Africano, os protozoários patogênicos já foram detectados em rios de alguns países, que possuem uma renda média por pessoa inferior a 1 \$ dólar, logo o acesso à água tratada e a falta de saneamento expõe a população destes locais a giardiose e a criptosporidiose (Squire e Ryan, 2017).

Embora as fontes de contaminação e introdução de bactérias indicadoras e protozoários patogênicos no ambiente aquático possam ter a mesma origem, muitos estudos não estabeleceram associação entre indicadores e protozoários em diferentes corpos d'água (Duris et al., 2013; Xiao et al., 2017; Brooks et al., 2020).

No presente estudo, também não se verificou correlação entre a concentração de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*, tanto nas amostras de águas doces como marinhas. Além disso, em alguns meses de monitoramento, especialmente nas praias de Guaratuba e Matinhos, ambos os protozoários foram detectados em expressivas concentrações tanto na água do rio quanto em água do mar, sendo as mesmas consideradas com melhor qualidade microbiológica, principalmente nos meses de Junho, Julho, Agosto, Novembro e Dezembro de 2017 e, Outubro de 2018 para pelo menos um dos indicadores analisados. Desta forma, questiona-se a utilização destes indicadores como preditores de contaminação fecal por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., evidenciando a necessidade da inclusão do monitoramento destes patógenos em uma legislação estadual específica de balneabilidade.

Estes dados também sinalizam a importância de monitorar não somente a qualidade microbiológica da água do mar, mas também de instauração da avaliação da qualidade dos corpos hídricos que afluem para estes locais. Todos estes dados foram discutidos e repassados ao IAP, inclusive, com a indicação da utilização de mais de um indicador para atestar a contaminação fecal, visto que em três meses diferentes e para todas as praias, só se observou maior impacto de contaminação fecal em águas doces ao se mensurar as concentrações de enterococos. - Julho de 2017 em Guaratuba, Setembro de 2018 em Matinhos e Outubro de 2018 em Caiobá (Tabela 8).

De modo geral, para os dois anos de monitoramento de indicadores e protozoários, as maiores concentrações de contaminação fecal foram evidenciadas no primeiro ano de monitoramento, sendo significativa a diminuição do aporte de material fecal no segundo ano de análise. Quando considerada a contaminação por protozoários no segundo ano de monitoramento, observou-se diminuição das taxas de contaminação nas águas doces e, especialmente em todos os pontos de água do mar – detectados somente em duas amostras – ante oito do primeiro ano.

Isto pode estar relacionado com a ampliação do saneamento básico das cidades praianas paranaenses, principalmente para a praia de Guaratuba onde em 2017, registrou 50% da contaminação por protozoários (rio e mar) de todo o ano entre todos os pontos e, no ano de 2018, apenas uma amostra foi positiva para protozoários no Rio de Guaratuba, não sendo detectados em nenhuma amostra de água do mar.

Em 2017, a taxa de tratamento de esgoto em Guaratuba era de 83,11 % e no ano seguinte, atingiu 100% de cobertura de saneamento ambiental (SNIS 2017; ABES, 2018). Já para a cidade de Matinhos, onde estão inseridas a praia de Matinhos e o Balneário de Caiobá, o saneamento ambiental evoluiu timidamente de um ano para o outro: 63,39% em 2017, para 65,04% em 2018. Assim, mesmo com o leve incremento nas taxas de saneamento para estes locais, os protozoários foram detectados em 16,6% das amostras de água do rio do Canal de Caiobá em ambos os anos e, com aumento nas taxas de contaminação em 2018 na água do mar do mesmo ponto.

Em adição, para o segundo ano, a maior concentração de cistos de *Giardia* entre todos os seis pontos analisados foi verificada na água do mar de Matinhos.

A detecção destes parasitos em ambientes que recebem efluentes domésticos é importante, visto que o tratamento de esgoto no país ainda é considerado precário: 100

milhões de brasileiros não tem acesso ao saneamento ambiental, somente 52,36% do esgoto é coletado e deste total, apenas 46% é efetivamente tratado, o que compromete a saúde, qualidade de vida e o índice de desenvolvimento humano estipulado em rankings nacionais e internacionais (Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento, 2018; Instituto Trata Brasil, 2019).

Ressalta-se que no presente estudo, quando consideradas todas as amostras positivas em ambos os biomas analisados, o protozoário do gênero *Giardia* foi detectado com maior frequência - 62,5% (n = 15 / 24) o que também pode refletir a taxa de infecção da população autóctone destes locais, especialmente em períodos considerados como de baixa temporada.

A giardiose apresenta distribuição cosmopolita e os cistos de *Giardia* apresentam-se em altas concentrações em águas residuárias (efluentes brutos) em várias partes do mundo, o que também pode indicar a taxa de infecção em diferentes populações do planeta (Nasser et al., 2012). A prevalência e concentração de cistos de *Giardia* em esgoto bruto já foram reportadas nos Estados Unidos, França, Canadá, Japão, Israel, Escócia, Espanha, China, Itália, Malásia, Noruega, África do Sul e Brasil, em concentrações variando de 0 a 100.000 cistos / L.

A pesquisa de determinados agentes patogênicos em efluentes brutos representa estratégia interessante para o reconhecimento de aspectos importantes que vão muito além da epidemiologia ambiental - *Wastewater-based epidemiology* (WBE) sendo inclusive, aconselhada na atualidade para o monitoramento de COVID-19 como indicativo e reconhecimento de possíveis novos focos em cidades e estados de diferentes países, para a contenção ou mitigação de surtos. Ao realizar a detecção molecular do vírus pode-se inferir a presença de infecções em toda a comunidade ou

localidade (Daughton, 2020). Inclusive, a utilização de WBE é apontada por pesquisadores como a única metodologia que poderia ser empregada para testagem em massa de populações, de modo mais rápido e com menor custo (Daughton, 2020). Até o presente momento, não se tem relatos da presença do vírus em áreas costeiras mundiais.

Entretanto, mesmo com a vigilância de águas residuais, a ampliação e a universalização do saneamento ambiental, deve-se ressaltar que o transporte de matéria orgânica e de patógenos para ambientes aquáticos pode ser consequência não somente do esgoto doméstico despejado na água, mas também através do carreamento por chuvas, escoamento de sedimentos, presença de animais domésticos e silvestres, especialmente aves marinhas, a recorrente presença de línguas negras ao longo da faixa de areia - verificadas em todas as praias do litoral do Paraná no presente estudo - e, a contaminação continua da areia das praias para o mar associado ao contingente de banhistas (Fayer e Lindsay, 2004; Bradshaw et al., 2016; Devane et al., 2018; Weiskerger et al., 2019).

A degradação de mata ciliar também pode acarretar no aumento do aporte de material fecal e consequentemente, de patógenos e bactérias indicadoras em áreas costeiras (Silva, 2017).

Dentre estas fontes, deve-se mencionar o importante papel de disseminação de cistos e oocistos de ambos os protozoários por aves marinhas e outras aves migratórias (Graczyk et al., 2008). Elevadas concentrações de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium parvum* foram detectados em excrementos de gansos canadenses migratórios: $4,1 \times 10^3$ e $3,7 \times 10^3$ respectivamente (Graczyk et al., 1998), assim como em patos migratórios no Novo México, Estados Unidos - $4,4 \times 10^4$ e $4,8 \times 10^2$ respectivamente (Kuhn et al., 2002).

Além disso, o aporte de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. que são produzidos durante a infecção por outros hospedeiros, incluindo seres humanos, e eliminados no ambiente é imenso: (10^7 e 10^6 a 10^9) respectivamente, podendo serem carreados por diversas vias para o ambiente marinho (Chappell, 1996; Bukhari e Smith 1997; Geurden et al., 2004).

Quando consideradas as diferentes fontes de introdução de protozoários em áreas costeiras e os resultados de ocorrência de *Giardia* e *Cryptosporidium* nas praias analisadas no presente estudo, fica evidente a necessidade de monitoramento de ambos os parasitos, mesmo em cidades litorâneas com excelentes indicadores de coleta e tratamento de esgoto, sendo este, outro ponto importante que norteia a inclusão destas análises em futura proposição de legislação estadual de balneabilidade.

Adicione-se a este cenário a ampla dispersão de ambos os protozoários em todas as praias, confirmada em diferentes meses e, em todas elas especificamente no mesmo mês (Agosto / 2017), onde os protozoários foram detectados em cinco dos seis pontos monitorados (Tabela 6). A contaminação por protozoários patogênicos pode ser ainda maior, quando se considera que apenas um ponto de água do mar de cada praia foi selecionado para o monitoramento, exibindo um “retrato” muito específico, visto que os Municípios de Matinhos e Guaratuba apresentam uma extensa orla - 19 km e 15 km respectivamente (Paraná, 2006).

Entretanto, ao considerar a contaminação das praias isoladamente e por ano, não se observou um padrão uniforme de distribuição de ambos os protozoários patogênicos. Esta intermitência de contaminação de áreas costeiras por protozoários também foi evidenciada em um amplo estudo de três anos de monitoramento conduzido na costa da Califórnia, Estados Unidos, utilizando moluscos bivalves – mexilhões (*Mytilus* spp.)

como sentinelas de contaminação de espécies de *Cryptosporidium* em três áreas, duas delas consideradas de possível alto risco de contaminação pelo parasito – uma impactada por fezes de gado e outra antroponótica e, uma terceira considerada de menor risco / impacto de contaminação (Miller et al, 2005). Assim como em nosso estudo, durante o primeiro ano do monitoramento, os autores identificaram contaminação por protozoários em todas as áreas eleitas para a pesquisa. Porém, no segundo e no terceiro ano, vários pontos de coleta apresentaram queda nas taxas de contaminação e, inclusive sendo nula em algumas áreas monitoradas.

Tomados em conjunto, os dados do estudo californiano e os dados do presente estudo, demonstram a importância da realização de estudos de monitoramento de áreas costeiras por períodos prolongados, para estimar a real contaminação destes locais por protozoários, quando se considera a possibilidade de intermitência.

Fatores abióticos, entre eles a variabilidade e mudanças climáticas também têm sido relacionados com a crescente incidência de doenças parasitárias em seres humanos (Polley et al., 2010). De fato, condições climáticas diversas aliadas a diferentes variáveis físico-químicas ambientais – entre estas as mais relevantes a precipitação, temperatura e umidade do ar e temperatura da água – estão associadas à sobrevivência e dispersão de patógenos, como os protozoários patogênicos para vários biomas aquáticos ou costeiros (Rosenthal, 2009; Lafferty, 2009).

No geral, há uma associação positiva entre a criptosporidiose e temperaturas ambientais em regiões tropicais e de clima temperado no mundo, assim como também foi verificada associação entre temperaturas mensais e a ocorrência de giardiose em estudos americanos e na Nova Zelândia (Lal et al., 2013). No presente estudo, também constatou-se associação positiva significativa entre a temperatura e concentração de

protozoários patogênicos no Rio de Matinhos no primeiro ano de monitoramento ($p = 0,02$, $r = 0,62$).

Quando considerado os dois anos de monitoramento, verificou-se uma correlação positiva mais forte entre a temperatura da água e presença de protozoários no Canal de Caiobá durante a estação do verão ($r = 0,9$; $p < 0,05$), assim como para o ponto de mar de Caiobá, verificou-se significância entre protozoários e temperatura durante a estação do outono ($p < 0,05$) ($r = -0,16$). Desta forma, é possível afirmar que houve influência da sazonalidade averiguada em um período de dois anos, isto é, com o aumento da temperatura, observa-se também aumento da concentração de protozoários nos ambientes aquáticos, fato este também verificado por Hu et al. 2007, que observaram associação significativa com a temperatura sazonal durante o período compreendido entre 1996 a 2004, verificando que a cada aumento de 1°C na temperatura prevista, 50 casos extras de criptosporidiose em humanos eram reportados na Austrália.

Com os efeitos do aquecimento global e as ações das mudanças climáticas, pode haver um aumento da dispersão e introdução de ambos os protozoários patogênicos em áreas anteriormente consideradas muito frias (Lal et al., 2013).

Para o presente estudo, a turbidez também apresentou-se como um importante fator significativamente associado à ocorrência de protozoários patogênicos tanto em águas doces como marinhas sugerindo que os protozoários estiveram vinculados ao material particulado em suspensão nos ambientes aquáticos. Este parâmetro mostrou-se significativamente associado à ocorrência de protozoários na água do mar da praia de Guaratuba, nas análises conduzidas separadamente – para o primeiro ano de monitoramento – e, quando considerados os dois anos de monitoramento em diferentes

estações do ano, como o inverno e a primavera ($r = 0,9$ e $r = 0,7$) respectivamente, ($p < 0,05$) para ambos.

A correlação entre protozoários e turbidez, também mostrou ser relevante no ponto de Canal de Caiobá, durante a estação de inverno ($r = 0,91$). De acordo com Brookes et al. 2005, a associação de protozoários com a matéria orgânica ou outros componentes como partículas em suspensão presentes na água, pode facilitar o transporte e dispersão em cursos hídricos. Além disso, oocistos de *Cryptosporidium* spp. exibem maior afinidade a partículas orgânicas e, por apresentar carga superficial negativa, aderem-se fortemente a partículas de carga contrária (Dai et al., 2004).

A adesão a superfícies carregadas positivamente é importante para *Cryptosporidium parvum* enquanto que para *Giardia duodenalis*, esse fator não se mostra determinante, entretanto, *Giardia* também se adere fortemente a partículas em suspensão, por apresentar marcada hidrofobicidade (Dai et al., 2004), sendo a turbidez portanto, um parâmetro essencial e que deve ser considerado em estudos de monitoramento de ambos os parasitos em ambientes costeiros.

Na costa da Tailândia foi conduzido um estudo de monitoramento de três anos (2005 a 2008) para pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia* em água doce, de estuário e água do mar, com a finalidade de obter informações da distribuição desses parasitos nas principais províncias afetadas pelo evento catastrófico do Tsunami, ocorrido em 2004 (Srisuphanunt et al. 2010). Os resultados revelaram que em média, entre todos os pontos analisados, oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados em concentrações 1,6 maiores do que a concentração de cistos de *Giardia* spp, e que, assim como no presente estudo, a concentração de protozoários esteve significativamente relacionada com a turbidez mais elevada das amostras. Em adição, a concentração tanto

de cistos quanto de oocistos também não apresentou correlação com indicadores de contaminação (coliformes totais e fecais), considerados muito menos restritivos do que os utilizados para sinalizar contaminação de origem fecal no presente estudo.

Em alguns estudos se comprovou que o pH também pode estar relacionado com a presença de protozoários em ambientes aquáticos. Nas Filipinas, Paller et al. (2017) verificaram correlação negativa entre a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. e pH ($r = -0,14$ e $-0,24$) respectivamente. Além disso, os autores pontuaram que concentrações de pH em hiperbasicidade ou alta acidez pode afetar a infectividade dos (oo)cistos. No presente estudo, estas correlações foram variáveis, dependendo do ponto analisado onde se verificou tanto correlações positivas para os pontos de mar de Guaratuba e mar de Caiobá na primavera, quanto fortemente negativas nos pontos de canal de Caiobá no inverno e mar de Matinhos na primavera ($p > 0,05$).

Entre as 17 novas metas para o desenvolvimento sustentável, o tópico de número 14, - vida na água – conservação e uso sustentável dos oceanos, mares e dos recursos marinhos, também há a proposição de um planejamento que envolve ações para o controle dos impactos que promovem a aceleração da acidificação dos oceanos, inclusive por meio do reforço ou criação de novas estratégias de ampla abrangência de cooperação científica para este fim (United Nations, 2015).

Com o aumento das concentrações de CO_2 na atmosfera devido à poluição do ar e consequentemente ao aquecimento global, também ocorre o aumento de temperaturas do oceano (IPCC, 2013). Em média, até 30% do CO_2 presente na atmosfera é absorvido por oceanos, e o CO_2 em contato com a água, produz H_2CO_3 (ácido carbônico), que se dissocia no mar, liberando íons H^+ , promovendo uma diminuição do pH e portanto, acidificação da água (Doney et al., 2009; Dobretsov et al., 2019). Os biomas de águas

doces paranaenses apresentaram médias anuais de pH mais ácidas, quando comparados aos biomas marinhos, considerados em sua maioria com pH neutro em ambos os anos de monitoramento.

A dispersão de protozoários em água do mar é influenciada pela salinidade, visto que com o seu aumento, a concentração de protozoários diminui (Bradford e Schijven, 2002). Este fato foi verificado na água do mar da praia de Matinhos durante a primavera onde a concentração de protozoários esteve fortemente correlacionada negativamente com a salinidade ($r = - 0,91$; $p > 0,05$) em 24 meses de monitoramento. Neste ponto, para os meses de primavera (outubro, novembro e dezembro) a salinidade variou de 30,6 a 33 ‰, meses em que foi considerada como água salina, e a presença de protozoários não foi detectada, entretanto, em outubro de 2018, foi detectada a maior concentração de protozoários entre todos os pontos de água do mar, onde o ambiente se apresentou como salobro (27 ‰) e sob maior influência de água doce.

No Brasil, mais estudos são necessários para a compreensão da epidemiologia ambiental de ambos os parasitos em áreas costeiras destinadas a recreação, visto que o mesmo é considerado um país continental, com imensa área costeira e, a realidade de cada região, aspectos de saneamento ambiental e as mensurações de parâmetros físico-químicos podem diferir significativamente.

Os dados gerados pelo método de referência Americano ou pelo método muito similar a este preconizado pela ISO 15553 (2006) são específicos para muitas espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia*, apresentando possibilidade de discriminação entre organismos vivos ou mortos, e a vantagem de ser quantitativo, porém, sem especificar a espécie, grupo genético ou genótipo (USEPA, 2012; ISO 15553, 2006).

Para estudos que tenham como foco a avaliação da qualidade da água de diferentes matrizes hídricas e sua relação com a saúde pública, considera-se como primeira prioridade a informação sobre a presença ou ausência de dado patógeno nestes ambientes (Srisuphanunt et al. 2010; USEPA, 2012). Isto se torna ainda mais relevante em áreas onde o perfil epidemiológico é desconhecido e a presença destes protozoários nunca foi determinada, como as áreas costeiras do presente estudo, onde a principal meta consistiu em realizar o monitoramento de ambos os gêneros de protozoários por dois anos em águas costeiras, visando verificar sua ocorrência para a proposição de legislação estadual de balneabilidade.

Alguns estudos demonstraram a contaminação por cistos de *Giardia* spp. em águas marinhas ou salobras (estuarinas) no Brasil, porém, poucos estudos foram capazes de identificar as espécies, grupos genéticos ou genótipos no país (Souza et al, 2013; Leal et al., 2013, 2018a). Há especial escassez de dados acerca da epidemiologia molecular de espécies de *Cryptosporidium* e subtipos em áreas costeiras no Brasil, até o presente momento.

No litoral sul do estado de São Paulo, em um dos maiores estuários em termos de produtividade primária do mundo localizado na cidade de Cananeia, que alberga importante região produtora de ostras depuradas com luz ultravioleta e destinadas ao consumo humano, comprovou-se ampla dispersão de cistos de *Giardia duodenalis* (Leal et al., 2013) em todos os pontos de água monitorados referente ao cultivo dos animais, bem como, em tecidos branquiais e no líquido interno de dúzias de ostras, antes e após o procedimento de depuração.

A utilização de separação imunomagnética (IMS) com microesferas contendo anticorpos de captura anti-*Giardia* seguida de reação de imunofluorescência direta e

PCR como ferramentas para confirmação da contaminação, revelou que 58,3% das amostras de ostras depuradas para o consumo humano, albergavam cistos de *Giardia* sendo que, a caracterização molecular e sequenciamento, demonstrou contaminação pelo subgenótipo AII (Leal et al., 2018a). Este subgenótipo é comumente relatado em infecções em seres humanos e, permitiu a rastreabilidade da fonte de contaminação fecal, revelando que a contaminação do estuário, se dera por esgoto doméstico, visto que este é considerado antroponótico. Além disso, de acordo com a legislação vigente para o cultivo de moluscos bivalves (CONAMA 357 / 2005), todas as áreas de cultivo dos bivalves (engorda) foram consideradas microbiologicamente adequadas e com pequenas concentrações de indicadores de contaminação fecal.

O subgenótipo AII também foi detectado em diferentes pontos de águas salobras, assim como o grupo genético C, que exibe especificidade parasitária por canídeos, demonstrando que a contaminação por animais domésticos também era relevante na região de estudo (Leal et al., 2018a). Oocistos de *Cryptosporidium* spp. somente foram detectados em um ponto de água salobra, em 16,6 % das amostras analisadas.

Em Florianópolis, Santa Catarina, ostras cultivadas em laboratório foram alocadas em quatro pontos da ilha por 14 dias, sendo utilizadas como bioindicadores de contaminação por cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, assim como uma amostra de água de cada ponto foi analisada também após o referido período (Souza et al., 2012). Oocistos de *Cryptosporidium* foram confirmados no pool amostrado de um dos pontos de alocação dos animais em água do mar. A contaminação por cistos de *Giardia duodenalis* foi evidenciada na água de outro ponto altamente impactado por efluentes brutos, sendo o genótipo A identificado.

No presente estudo, ensaios de biologia molecular também foram empregados como ferramenta complementar de confirmação da contaminação de rios e água do mar por ambos os parasitos. Entre as nove amostras positivas detectadas por RID, a presença de DNA de *Cryptosporidium* mediante amplificação de fragmentos específicos do gene *18S* por *nested* PCR foi verificada em 44,4 % (4 / 9) amostras em duas das três praias monitoradas. O DNA do parasito foi identificado tanto no bioma marinho como de água doce da praia de Guaratuba e, em duas amostras de água do mar da praia de Caiobá, mediante utilização dos iniciadores descritos por Silva et al., 2013.

Esta é a primeira vez que oocistos de *Cryptosporidium* spp. são identificados por duas técnicas que apresentam alta sensibilidade de detecção em áreas costeiras no Brasil e, o primeiro estudo a comprovar a detecção do material genético do protozoário em diferentes praias no país.

As reações de PCR realizadas utilizando iniciadores de Xiao e colaboradores (1999) são amplamente empregadas no mundo, tendo sido utilizadas primariamente também neste estudo. Entretanto, ao utilizar estes iniciadores, em nenhuma amostra se observou amplificação de DNA. O fragmento do gene descrito por Silva et al (2013) é menor do que o proposto por Xiao et al (1999) que fornece uma amplificação primária de mais de 1300 pares de nucleotídeos e, uma amplificação secundária de cerca de 800 pares de bases.

Sabe-se que fragmentos menores apresentam melhor eficiência de amplificação em reações de PCR, e que quanto maior o produto de PCR, este torna-se mais suscetível à interferência de inibidores de polimerização (Piyamongkol et al., 2003). Este fato é ainda mais desafiador e relevante, especialmente quando a tentativa de amplificação de DNA é feita em amostras ambientais hídricas, onde inibidores são frequentes e

inclusive, a concentração de oocistos e também de cistos é pequena (Girones et al., 2010; Squire et al., 2017).

Dentre as amostras positivas por RID para *Giardia*, em 17,7% destas foi possível a confirmação de *Giardia duodenalis* - a única com potencial para infectar seres humanos - mediante amplificação de fragmento específico do gene tpi por *nested* PCR. A contaminação por esta espécie foi evidenciada em duas das três praias monitoradas – no rio e água do mar da praia de Guaratuba e no canal de Caiobá. O gene TPI possui sequências de nucleotídeos com alto grau de polimorfismo sendo suficientemente discriminatório para diferenciar os subgrupos genéticos de *G. duodenalis* (Sulaiman et al., 2003; Feng et al., 2011).

Apesar de os métodos de referência mundial apresentarem custos elevados e a limitação de não discriminarem informações acerca de espécies e genótipos, recomenda-se a utilização de ambas as técnicas (imunológicas e moleculares), para o monitoramento de ambos os protozoários em água do mar ou outras áreas recreacionais. Alguns estudos realizaram a comparação entre estes dois métodos de detecção para o isolamento de protozoários em áreas costeiras, utilizando moluscos bivalves como indicadores, porém, não conseguiram estabelecer qual metodologia seria superior para este fim (Robertson, 2007).

Gómez-Couso et al., 2006 atestaram positividade para oocistos de *Cryptosporidium* em 42 amostras de tecidos de mexilhões na Espanha por RID. Entretanto, ao se utilizar métodos moleculares, em 38 das 42 amostras positivas por RID, foram negativas quando utilizada a PCR, isto é, a PCR não foi capaz de identificar a contaminação pelo parasito em 90,5% destas amostras. De acordo com os autores, isto pode estar relacionado com a presença de inibidores na amostra e, ao fato de a RID ser

capaz de detectar cistos e oocistos considerados como “empty”- vazios. Para outros lotes de animais, 26 amostras foram consideradas positivas por PCR e 12 delas negativas por RID, ou seja, a RID não foi capaz de identificar o protozoário em 46,1 % das amostras analisadas.

É importante enfatizar, entretanto, que apenas a utilização da PCR para detecção de protozoários em águas costeiras, apesar de apresentar boa sensibilidade de detecção, evidenciará apenas o DNA dos parasitos e não cistos e oocistos intactos, o que pode representar um baixo risco de infecção para banhistas (Girones et al., 2010; Ryan et al., 2019).

A coloração por DAPI utilizada como teste confirmatório da presença de protozoários em amostras ambientais, devido ao corante vital marcar núcleos de cistos e oocistos dos protozoários em análise de epifluorescência, também tem sido utilizada como fator capaz de prever se a extração e amplificação de DNA será bem sucedida, visto que a presença de esporozoítos em oocistos e presença de núcleos em cistos, são essenciais em estudos de caracterização molecular (Kifleyohannes e Robertson, 2020). No presente estudo, o pequeno número de parasitos visualizados nas lâminas de imunofluorescência (um ou no máximo dois) em todas as amostras analisadas, gerando consequentemente baixa concentração de DNA extraído e disponível para reações de amplificações, aliado a ausência de núcleos, indicado pela ausência de coloração por DAPI em algumas das 24 amostras consideradas RID (+) e DAPI (-) representam fatores que podem ter inviabilizado algumas análises moleculares.

Finalmente, outro ponto importante que deve ser considerado quanto a necessidade de elaboração de legislação que preconize a pesquisa de ambos os protozoários em áreas frequentadas por banhistas e nadadores, consiste no longo

período em que estes estádios evolutivos permanecem infectantes sob diferentes concentrações de salinidade e oscilação de temperatura.

Oocistos de *Cryptosporidium parvum* mantidos em aquários marinhos em concentrações de 10, 20 e 30 ppt em temperaturas de 10°C mantiveram-se infectantes por até 12 semanas mediante bioensaio utilizando como modelo camundongos Balb/c (Fayer et al., 1998). Do mesmo modo, oocistos armazenados em condições artificiais de 10 ppt de salinidade a 20°C, também foram capazes de infectar camundongos. Entretanto, ao aumentar a temperatura para 20°C e concentrações de salinidade mais elevadas - 20 e 30 ppt, os oocistos se mantiveram infectantes por oito e quatro semanas respectivamente (Fayer et al., 1998).

Um estudo similar conduzido na Itália onde oocistos de *C. parvum* foram mantidos por até 12 meses em tanques contendo água do mar artificial, em temperaturas inferiores e controladas (6 a 8 °C) e oxigenação moderada, demonstrou que mesmo após um ano de armazenamento, foram capazes de infectar modelos murinos (Tamburrini e Pozio, 1999).

C. hominis é responsável junto com *C. parvum* por 90% dos casos de infecções em seres humanos e, exibe marcada especificidade por hospedeiros, apresentando um ciclo biológico preferencialmente antroponótico. Entretanto, a infecção por *C. hominis* já foi detectada no trato gastrointestinal de peixe-boi marinho (Zahedi et al., 2016), o que aumenta o risco de exposição de banhistas contraírem a criptosporidiose via contato recreacional.

Do mesmo modo, cistos de *Giardia* manteriam-se infectantes por tempo suficiente em condições salinas e salobras, visto que a infecção de uma ampla gama de mamíferos marinhos - especialmente focas e golfinhos - pelos protozoários já foi reportada (Fayer et al., 2004; Thompson e Ash, 2019), inclusive no Brasil, tendo sido

detectado em cetáceos, lontras e outros mamíferos (Borges et al., 2017). Além disso, dois surtos de giardiose associados ao consumo de ostras, já foram reportados nos Estados Unidos (Ryan et al., 2019). Logo, a salinidade presente no mar não é um fator determinante para a inativação destes protozoários.

Em adição, a contaminação por cistos e oocistos nesses ambientes pode por meio de dispersão entrar em contato com invertebrados marinhos filtradores e assim, se inserir a rede de cadeias tróficas, contribuindo com a ampliação e dispersão para mamíferos marinhos e, para a manutenção de ciclos parasitários destas protozooses no ambiente marinho (Giangaspero et al., 2008).

Neste contexto, as infecções gastrointestinais relacionadas ao contato ou ingestão acidental de águas contaminadas são responsáveis por ocasionar 2.2 milhões de mortes por ano, principalmente em crianças (OMS, 2018), enquanto a carga global de doenças em seres humanos devido a poluição de águas costeiras por águas residuais foi estimada em quatro milhões anualmente (Moore et al., 2013).

O monitoramento efetuado no presente estudo durante dois anos de protozoários patogênicos e bactérias indicadoras nas principais praias do estado do Paraná, fornece resultados relevantes para os órgãos públicos de saúde e agências ambientais, por caracterizar e gerar dados sobre a segurança sanitária e balneabilidade das praias.

O presente estudo fornece dados que devem produzir impactos positivos de ordem ambiental, sendo o principal impacto esperado e reivindicado pelo órgão ambiental do Paraná, a proposição de uma legislação ou resolução estadual de balneabilidade para a pesquisa de protozoários patogênicos não contemplados pela legislação Federal de balneabilidade.

Além disso, com os resultados obtidos, é possível que decisões estratégicas sejam adotadas quanto à gestão da costa do Paraná, visando melhorar a qualidade das águas e diminuição dos impactos ambientais, visto que a presença de patógenos em áreas recreacionais poluídas, também reflete negativamente na região, com prejuízos econômicos para o turismo, além de constituírem um risco para a saúde pública.

7. CONCLUSÕES

1. A contaminação e ampla dispersão de protozoários patogênicos foram evidenciadas pela primeira vez em praias da costa do estado do Paraná, sendo este, o estudo mais longo conduzido para a detecção destes patógenos em diferentes biomas de áreas recreacionais costeiras no Brasil.

2. Comprovou-se importante contribuição e introdução de parasitos e bactérias em água do mar pelos seus afluentes, biomas de água doce, altamente impactados por contaminação fecal, denotando má qualidade sanitária e, a necessidade de ampliação das taxas de coleta e tratamento de esgoto em ambos os municípios estudados.
3. A detecção de DNA de *Cryptosporidium* foi comprovada pela primeira vez em praias do Brasil, sinalizando a importância da utilização de diferentes técnicas de detecção para o monitoramento destes ambientes, especialmente quando se considera a escassez de dados referentes à epidemiologia molecular do protozoário no país.
4. Evidencia-se a necessidade de ampliação do monitoramento não somente da qualidade microbiológica da água do mar, mas também dos corpos hídricos que desaguam na mesma, alterando em nova resolução estadual, os indicadores alvos contemplados pela legislação vigente, há 20 anos sem revisão, por indicadores mais restritivos, como bactérias do gênero *Enterococcus* sp. e, a inclusão de pelo menos dois indicadores de contaminação fecal tanto em água doce como salina.
5. Reitera-se a necessidade de proposição de legislação que regule a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em áreas costeiras destinadas a recreação humana, visto que não se comprovou correlação entre os organismos preconizados por legislação nacional e a contaminação por protozoários.
6. A necessidade de criação da legislação é respaldada, ainda, devido às diferenças biológicas entre parasitos e bactérias e aspectos de resistência e longevidade no ambiente marinho - acentuada em protozoários, por apresentarem baixa dose infectante e, por poder representar um maior risco para populações mais vulneráveis, como indivíduos imunodeficientes devido ao caráter oportunista de alguns protozoários, inclusive com risco de óbito.

8. REFERÊNCIAS

ABES. Ranking 2018. Disponível em: <http://abes-dn.org.br/?p=18536>. Acesso em: 25/04/2020.

ABDUL, R. N. R. I. R.; ISA, M. L. M., YUSOF, A. M. A Review of *Cryptosporidium* spp. Infection In Livestock. **Jurnal Teknologi**, v. 79, n. 6, 2017.

ACKERMAN, D.; WEISBERG, S. B. Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica Bay beaches. **Journal of water and health**, v. 1, n. 2, p. 85-89, 2003.

AGÊNCIA EUROPÉIA DO MEIO AMBIENTE. y. Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of February 2006 Concerning the Management of Bathing Water Quality and Repealing Directive 76/160/EEC; **European Environment Agency: Geneva, Switzerland, 2006.**

ALBUQUERQUE, A. L. S. Evolução urbana e caracterização geoambiental da planície costeira do município de Paripueira-Alagoas. 2016.

ALMEIDA, J. C., MARTINS, F.D., FERREIRA NETO, J. M., SANTOS, M. M., GARCIA, J. L., NAVARRO, I. T., KURODA, E. K., FREIRE, R. L. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system, Parana, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 24 (3):303–8, 2015.

ANGULO, R. J. Mapa do Cenozóico do litoral do Estado do Paraná. **Boletim Paranaense de geociências**, v. 55, 2004.

ANKARKLEV, J., JERLSTRÖM-HULTQVIST, J., RINGQVIST, E., TROELL, K., SVÄRD, S. G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 413-422, 2010.

ANKARKLEV, J., LEBBAD, M., EINARSSON, E., FRANZÉN, O., AHOLA, H., TROELL, K., SVÄRD, S. G. A novel high-resolution multilocus sequence typing of *Giardia intestinalis* assemblage A isolates reveals zoonotic transmission, clonal outbreaks and recombination. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 60, p. 7-16, 2018.

ARAÚJO, R. S., FERNANDES LN, CARVALHO TT, SATO MI, SOARES RM, MATTÉ GR, MATTÉ MH. Genotypic characterization of *Cryptosporidium hominis* from water samples in São Paulo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 5, p. 834-838, 2011.

AWWA, WEF. Standard Methods for examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington: **American Public Health Association**; 2012, 1360 pp. ISBN 978-087553-013-0

BAIRD, R. B EATON, A. D., & CLESCERI, L. S. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, DC: American Public Health Association, 2012.

BALDURSSON, S; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks—an update 2004–2010. **Water Research**, v. 45, n. 20, p. 6603-6614, 2011.

BARTA, J. R., THOMPSON, R. C. A. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 10, p. 463-468, 2006.

BARTELT, L A.; SARTOR, R. B. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. **F1000prime reports**, v. 7, 2015.

BERG, C. H.; GUERCIO, M. J.; ULBRICHT, V. R. Indicadores de balneabilidade: a situação brasileira e as recomendações da World Health Organization. **International Journal of Knowledge Engineering and Management (IJKEM)**, v. 2, n. 3, p. 83-101, 2013.

BELL, C. AND KYRIAKIDES, A. E. coli: A Practical Approach to the Organism and Its Control in Foods. London: Blackie **Academic and Professional**, 1998.

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.

BAUTISTA, M., BONATTI, T. R., FIUZA, V. R. D. S., TERASHIMA, A., CANALES-RAMOS, M., JOSÉ, J., & FRANCO, R. M. B. Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in raw water samples from the Rímac River, Peru. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 12, p. 11454-11467, 2018.

BRADFORD, S. A.; SCHIJVEN, J. Release of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calf manure: impact of solution salinity. **Environ. Sci. Technol.** 36: 3916- 3923, 2002.

BRADSHAW, J. K., SNYDER, B. J., OLADEINDE, A., SPIDLE, D., BERRANG, M. E., MEINERSMANN, R. J., MOLINA, M. Characterizing relationships among fecal indicator bacteria, microbial source tracking markers, and associated waterborne pathogen occurrence in stream water and sediments in a mixed land use watershed. **Water Research**, v. 101, p. 498-509, 2016.

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: 20/09/2019.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 357/2005, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Disponível em:** <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acesso em: 21/09/2019.

BRASIL. Ministério do Turismo do Brasil (2014). O governo federal apresenta uma avaliação das ações da Copa do Mundo . Brasília: Portal da Copa do Mundo.

BRASIL. Ministério do Turismo do Brasil. Estudo da Demanda Turística Internacional 2016. Brasília: Internacional.

BRASIL. Ministério do Turismo do Brasil. Estudo da Demanda Turística Internacional 2018. Brasília: Internacional.

BRAVIM, A. D., SANT'ANNA, R. O.; BARROSO, G. F.; SILVEIRA, I. M. O. Avaliação da balneabilidade da Praia da Curva da Jurema (Vitória -ES), UFES, 2004.

BROOKES, J. D., HIPSEY, M. R., BURCH, M. D., REGEL, R. H., LINDEN, L. G., FERGUSON, C. M., ANTENUCCI, J. P. Relative value of surrogate indicators for detecting pathogens in lakes and reservoirs. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 22, p. 8614-8621, 2005.

BROOKS, Y. M., SPIRITO, C. M., BAE, J. S., HONG, A., MOSIER, E. M., SAUSELE, D. J., ANDERSON, R. R. Fecal indicator bacteria, fecal source tracking markers, and pathogens detected in two Hudson River tributaries. **Water Research**, v. 171, p. 115342, 2020.

- BON, B. R. da F. Resistência a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp. isolados de ambiente marinho. 2013.
- BORGES, J. C. G., DOS SANTOS LIMA, D., DA SILVA, E. M., DE OLIVEIRA MOREIRA, A. L., MARMONTEL, M., CARVALHO, V. L., ALVES, L. C. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* sp. in aquatic mammals in northern and northeastern Brazil. **Diseases of aquatic organisms**, v. 126, n. 1, p. 25-31, 2017.
- BORGES, A. Óleo que atingiu Nordeste e Sudeste veio da África, diz Inpe. Disponível em: <https://noticias.uol.com.br/ultimas-noticias/agencia-estado/2019/12/14/inpe-diz-que-oleo-veio-do-mar-da-africa.htm>. Acesso em: 05/03/2020.
- BESSEL L. Por que só o Rio pode receber uma Olimpíada no Brasil. 2016. Disponível em: <https://istoe.com.br/por-que-so-o-rio-pode-receber-uma-olimpiada-no-brasil/>. Acessado em: 08/02/2020.
- BUKHARI, Z.; SMITH, H. V. SHORT PAPER *Cryptosporidium parvum*: oocyst excretion and viability patterns in experimentally infected lambs. **Epidemiology & Infection**, v. 119, n. 1, p. 105-108, 1997.
- BURNETT, M. W. Giardiasis. **Journal of special operations medicine: a peer reviewed journal for SOF medical professionals**, v. 18, n. 1, p. 106-107, 2018.
- CACCIÒ, S.M.; SANNELLA, A. R.; MANUALI, E.; TOSINI, F.; SENSI, M.; CROTTI, D.; POZIO, E. Pigs as natural hosts of *Dientamoeba fragilis* genotypes found in humans. **Emerg Infect Dis**.18:838–48, 2012.
- CACCIO, S M.; LALLE, M; SVÄRD, S G. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 66, p. 335-345, 2018.
- CANTEY, P. T. ROY, S., LEE, B., CRONQUIST, A., SMITH, K., LIANG, J., BEACH, M. J. Study of nonoutbreak giardiasis: novel findings and implications for research. **The American journal of medicine**, v. 124, n. 12, p. 1175. e1-1175. e8, 2011.
- CEARRETA, A.; IRABIEN, M. J.; LEORRI, E.; YUSTA, I.; CROUDACE, I. W.; CUNDY, A. B. Recent anthropogenic impacts on the Bilbao estuary, northern Spain: geochemical and microfaunal evidence. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 50, n. 4, p. 571-592, 2000.
- CEBER, K., ASLAN, G., OTAĞ, F., DELIALIOĞLU, N., OZTÜRK, C., BABÜR, C., EMEKDAŞ, G. Investigation of *Cryptosporidium* spp. oocysts in tap water, well water, sewage water and sea water in Mersin, Turkey. **Turkiye parazitolojii dergisi**, v. 29, n. 4, p. 224-228, 2005.
- CERTAD, G., VISCOGLIOSI, E., CHABÉ, M., CACCIÒ, S. M. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Trends in parasitology**, v. 33, n. 7, p. 561-576, 2017.
- CASTRO-HERMIDA, J. A. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3528-3538, 2008.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL (US), 1981. *Morbidity and mortality weekly report: MMWR* (Vol. 29, No. 54). US Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Outbreaks Associated with Treated Recreational Water — United States, 2000–2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/wr/mm6719a3.htm>; Acessado em: 20/03/2020

CHAURET C, ARMSTRONG N, FISHER J, SHARMA R, SPRINGTHORPE S, SATTAR S. Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. *J Am Water Works Assoc* 87(11):76–84, 1995.

COELHO, C H; DURIGAN, M., LEAL, D. A. G., DE BERNARDI SCHNEIDER, A., FRANCO, R. M. B., & SINGER, S. M. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 10, p. e0006005, 2017.

COUTO, M. C. M.; SILVA, V. L., PINHEIRO, J., DO BOMFIM, T. C. B. (2016) Enzyme immunoassay use in the identification of *Giardia* spp. in *Perna perna* mussels destined for human consumption. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, n. Supl. 3, p. 165-170, 2016.

CORREIO LITORAL. _Guaratuba anuncia reforço na limpeza na praia na Virada do Ano 2019. Disponível em: <https://www.correiodolitoral.com/25069/guaratuba-anuncia-reforco-na-limpeza-na-praia-na-virada-do-ano/>. Acesso em: 13/01/2020.

CHAPPELL, C. L., OKHUYSEN, P. C., STERLING, C. R., DUPONT, H. L. *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. **The Journal of infectious diseases**, v. 173, n. 1, p. 232-236, 1996.

CHECKLEY, W. WHITE JR, A. C., JAGANATH, D., ARROWOOD, M. J., CHALMERS, R. M., CHEN, X. M., HUSTON, C. D. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 85-94, 2015.

CROCKETT, C. S.; HAAS, C. N. Understanding protozoa in your watershed. **Journal-American Water Works Association**, v. 89, n. 9, p. 62-73, 1997.

CROSS, J.; SCHIFF, K.; SCHAFER, H. Surface runoff to the Southern California Bight. **Southern California Coastal Water Research Project Annual Report**, v. 91, p. 1991-92, 1990.

DAI, X., BOLL, J., HAYES, M. E., ASTON, D. E. Adhesion of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to solid surfaces: the role of surface charge and hydrophobicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 34, n. 4, p. 259-263, 2004.

D'ANTONIO, R. G. WINN, R. E., TAYLOR, J. P., GUSTAFSON, T. L., CURRENT, W. L., RHODES, M. M., ZAJAC, R. A. Excystation of *Cryptosporidium parvum* at temperatures that are reached during solar water disinfection. **Annals of Internal Medicine**, v. 103, p. 886-888, 1985.

DAUGHTON, C. G. Wastewater surveillance for population-wide Covid-19: The present and future. **Science of The Total Environment**, p. 139631, 2020.

DE MEDEIROS MARTINS, L. M. DE ARAÚJO MEDEIROS, L. R., ROSAS, R. D. A. R., & REIS, A. L. Q. Análise dos parâmetros de balneabilidade: um estudo de caso sobre as praias dos municípios de João Pessoa e Cabedelo/PB. **Revista InterScientia**, v. 5, n. 1, p. 116-128, 2017.

- DEVANE, M. L., WEAVER, L., SINGH, S. K., GILPIN, B. J. Fecal source tracking methods to elucidate critical sources of pathogens and contaminant microbial transport through New Zealand agricultural watersheds—a review. **Journal of environmental management**, v. 222, p. 293-303, 2018.
- DICESARE, E. W.; HARGREAVES, B. R.; JELLISON, K. L. Biofilms reduce solar disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4522-4525, 2012.
- DURIS, J. W., REIF, A. G., KROUSE, D. A., ISAACS, N. M. Factors related to occurrence and distribution of selected bacterial and protozoan pathogens in Pennsylvania streams. **Water research**, v. 47, n. 1, p. 300-314, 2013.
- DOBRETISOV, S., COUTINHO, R., RITTSCHOF, D., SALTA, M., RAGAZZOLA, F., HELLIO, C. The oceans are changing: impact of ocean warming and acidification on biofouling communities. **Biofouling**, v. 35, n. 5, p. 585-595, 2019.
- DONEY, S. C., FABRY, V. J., FEELY, R. A., KLEYPAS, J. A. Ocean acidification: the other CO₂ problem. 2009.
- DOWBOR, L; TAGNIN, R. Arnaldo. Administrando a água como se fosse importante: gestão ambiental e sustentabilidade. **Senac**, 2005.
- DOWBOR, 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.
- DWIGHT, R. H., SEMENZA, J. C., BAKER, D. B., OLSON, B. H. Association of urban runoff with coastal water quality in Orange County, California. **Water Environment Research**, v. 74, n. 1, p. 82-90, 2002.
- EUROPEAN UNION (EU). Official Journal of the European Union. Concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. 2006.
- EFSTRATIOU, A; ONGERTH, J E.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks-an update 2011–2016. **Water research**, v. 114, p. 14-22, 2017.
- EFSTRATIOU, A.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. Evolution of monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. **Water research**, v. 123, p. 96-112, 2017.
- EINARSSON, E; MA'AYEH, S; SVÄRD, S G. An up-date on *Giardia* and giardiasis. **Current opinion in microbiology**, v. 34, p. 47-52, 2016.
- ESTADES, N. P. O litoral do Paraná: entre a riqueza natural e a pobreza social. **Desenvolvimento e meio ambiente**, v. 8, 2003.
- FAYER, R. Effect of sodium hypochlorite exposure on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts for neonatal BALB/c mice. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 2, p. 844-846, 1995.
- FAYER, R. SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. **The general biology of *Cryptosporidium***. CRC Press, Boca Raton, USA, 1997.

- FAYER, R.; GRACZYK, T. K., LEWIS, E. J., TROUT, J. M., & FARLEY, C. A. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 3, p. 1070-1074, 1998.
- FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in parasitology**, v. 20, n. 11, p. 531-536, 2004.
- FAYER, R., SANTÍN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 192-200, 2009.
- FEDERIGI, I; VERANI, M; CARDUCCI, Annalaura. Sources of bathing water pollution in northern Tuscany (Italy): Effects of meteorological variables. **Marine pollution bulletin**, v. 114, n. 2, p. 843-848, 2017.
- FENG, Y; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 110-140, 2011.
- FERGUSON, C. M., COOTE, B. G., ASHBOLT, N. J., STEVENSON, I. M. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. **Water Research**, v. 30, n. 9, p. 2045-2054, 1996.
- FIAMONCINI, L., PEREIRA, R. S., PIRES, G. de L. Jogos Olímpicos e Paraolímpicos Rio/2016: mídias em convergência (?) 2018.
- 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., BRANCO, N., LEAL, D. A. G. Parasitologia Ambiental: Métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 41, n. 2, 2012.
- FREITAS, C. M. de; BARCELLOS, C., ASMUS, C. I. R. F., SILVA, M. A. D., & XAVIER, D. R. Da Samarco em Mariana à Vale em Brumadinho: desastres em barragens de mineração e Saúde Coletiva. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, p. e00052519, 2019.
- GARCIA-R, J. C., FRENCH, N., PITA, A., VELATHANTHIRI, N., SHRESTHA, R., & HAYMAN, D. Local and global genetic diversity of protozoan parasites: spatial distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005736, 2017.
- GAUTRET, P., SCHLAGENHAUF, P., GAUDART, J., CASTELLI, F., BROUQUI, P., VON SONNENBURG, F., PAROLA, P. Multicenter EuroTravNet/GeoSentinel study of travel-related infectious diseases in Europe. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 11, p. 1783, 2009.
- GEURDEN, T., CLAEREBOU, E., VERCRUYSSSE, J., BERKVEN, D. Estimation of diagnostic test characteristics and prevalence of *Giardia duodenalis* in dairy calves in Belgium using a Bayesian approach. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1121-1127, 2004.

GHARPURE, R.; PEREZ, A.; MILLER, A. D.; WIKSWO, M. E.; SILVER, R., & HLAUSA, M. C. Cryptosporidiosis Outbreaks—United States, 2009–2017. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 68, n. 25, p. 568, 2019.

GIANGASPERO, A. N. N. U. N. Z. I. A. T. A., DI CAVE, D., FIORAVANTI, M. L., FRANGIPANE DI REGALBONO, A., BERRILLI, F., CAFFARA, M., PERRUCCI, S. Zoonotic protozoa in marine and lagoon shellfish: molecular study for the evaluation of the environmental pollution and risks for human consumption. In: **Atti XXV Congresso della Società Italiana di Parassitologia (SO. I. PA.)** p. 23, 2008.

GIRONES, R., FERRUS, M. A., ALONSO, J. L., RODRIGUEZ-MANZANO, J., CALGUA, B., DE ABREU CORRE^A, A., BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens in water—the pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, v. 44, n. 15, p. 4325-4339, 2010.

GÓMEZ-PARRA, A., FORJA, J. M., DELVALLS, T. A., SÁENZ, I., RIBA, I. Early contamination by heavy metals of the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar mining spill (SW Spain). **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 12, p. 1115-1123, 2000.

GRACIAA, D.S.; COPE, J.R.; ROBERTS, V.A.; CIKESH, B.L.; KAHLER, A.M.; VIGAR, M.; HILBORN, E.D.; WADE, T.J.; BACKER, L.C.; MONTGOMERY, S.P.; Outbreaks associated with untreated recreational water—United States, 2000–2014. **Am. J. Transplant.** 18, 2083–2087, 2018.

GRACZYK, T. K.; FAYER, R.; LEWIS, E. J.; FARLEY, C. A.; SULAIMAN, I.; LAL, A. A. *Giardia* sp. and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in the feces of migratory Canada geese (*Branta canadensis*). **Applied and Environmental Microbiology**. 64: 2736-2738, 1998.

GRACZYK, T. K.; LEWIS, E.J.; GLASS, G.; DA SILVA, A. J.; TAMANG, L.; GIROUARD, A. S. Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake bay. **Parasitol. Res.** 100: 247-253, 2007

GRACZYK, T. K.; MAJEWSKA A. C.; SCHWAB, K. J. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. **Trends in Parasitology**, 24: 55-59, 2008.

GUZMAN-HERRADOR, B.; CARLANDER, A.; ETHELBERG, S.; FREIESLEBEN DE BLASIO, B.; KUUSI, M.; LUND, V.; LOFDAHL, M.; MACDONALD, E.; NICHOLS, G.; SCHONNING, C. Waterborne outbreaks in the Nordic countries, 1998 to 2012. **Eurosurveillance** 2015, 20, 21160.

GOLDFARB F., 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, pp. 589-591, 1982.

GOMES, A. S.; PALMA, J. JC; SILVA, C. G. Causas e conseqüências do impacto ambiental da exploração dos recursos minerais marinhos. **Brazilian journal of geophysics**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2000.

GOMEZ-COUSO, H. AMAR, C. F. L., MCLAUCHLIN, J., ARES-MAZÁS, E. Characterisation of a *Cryptosporidium* isolate from water buffalo (*Bubalus bubalis*) by

sequencing of a fragment of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene (COWP). **Veterinary parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 139-144, 2005.

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

GÓMEZ-PARRA, A.; FORJA, J. M.; DELVALLS, T. A.; SÁENZ, I.; RIBA, I. Early contamination by heavy metals of the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar mining spill (SW Spain). **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 12, p. 1115-1123, 2000.

HAILE, R. W., WITTE, J. S., GOLD, M., CRESSEY, R., MCGEE, C., MILLIKAN, R. C., HARPER, J. The health effects of swimming in ocean water contaminated by storm drain runoff. **Epidemiology**, p. 355-363, 1999.

HARWOOD, V. J. LEVINE, A. D., SCOTT, T. M., CHIVUKULA, V., LUKASIK, J., FARRAH, S. R., & ROSE, J. B. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 6, p. 3163-3170, 2005.

HARWOOD, V.J.; STALEY, C.; BADGLEY, B.D.; BORGES, K.; KORAJKIC, A. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: Relationships between pathogens and human health outcomes. **FEMS Microbiol. Rev.** 38, 1–40, 2014

HE, L.; LU, J.; SHI, W. Variability of fecal indicator bacteria in flowing and ponded waters in southern California: Implications for bacterial TMDL development and implementation. **Water Research**, v. 41, n. 14, p. 3132-3140, 2007.

HEANEY, C. D., SAMS, E., DUFOUR, A. P., BRENNER, K. P., HAUGLAND, R. A., CHERN, E., NOBLE, R. Fecal indicators in sand, sand contact, and risk of enteric illness among beachgoers. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, v. 23, n. 1, p. 95, 2012.

HENRY, R., SCHANG, C., KOLOTELO, P., COLEMAN, R., ROONEY, G., SCHMIDT, J., MCCARTHY, D. T. Effect of environmental parameters on pathogen and faecal indicator organism concentrations within an urban estuary. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 174, p. 18-26, 2016.

HEYWORTH, M F. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. **Parasite**, v. 23, 2016.

HILLMAN, A., ASH, A., ELLIOT, A., LYMBERY, A., PEREZ, C., THOMPSON, R.C.A.. Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda (*Isodon obesulus*). **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.** 5, 110–115, 2016.

HLAVSA, M.C.; ROBERTS, V.A.; ANDERSON, A.R.; HILL, V.R.; KAHLER, A.M.; ORR, M.; GARRISON, L.E.; HICKS, L.A.; NEWTON, A.; HILBORN, E.D. Surveillance for waterborne disease outbreaks and other health events associated with recreational water—United States, 2007–2008. **MMWR Surveill. Summ.** 2011, 60, 1–32.

HORLOCK-ROBERTS, K. REAUME, C., DAYER, G., OUELLET, C., COOK, N., & YEE, J. Drug-free approach to study the unusual cell cycle of *Giardia intestinalis*. **Mosphere**, v. 2, n. 5, p. e00384-16, 2017.

- HU, W., TONG, S., Mengersen, K., Connell, D. E. S. Weather variability and the incidence of cryptosporidiosis: comparison of time series poisson regression and SARIMA models. **Annals of epidemiology**, v. 17, n. 9, p. 679-688, 2007.
- HUANG, D. B.; WHITE, A. C. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Gastroenterology Clinics**, v. 35, n. 2, p. 291-314, 2006.
- HUNTER, P. R., THOMPSON, R. C. A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1181-1190, 2005.
- HO, B. S.W., TAM, T.-Y. *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage-contaminated river waters. **Water Research**, v. 32, n. 9, p. 2860-2864, 1998.
- IBGE. **Atlas Geográfico das Zonas Costeiras e Oceânicas** 2011. Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2036>. Acesso em: 08/02/2020.
- IBGE. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua - PNAD Contínua. 2017 **Disponível em:** <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/multidominio/cultura-recreacao-e-esporte/17270-pnad-continua.html?=&t=o-que-e>. Acessado em: 20/09/2019.
- IBGE. Cidades. 2019 **Disponível em:** <https://cidades.ibge.gov.br/>. Acessado em: 20/09/2019.
- IPCC. Climate Change 2013: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2013.
- IPARDES. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. Disponível em: http://www.ipardes.gov.br/index.php?pg_conteudo=1&cod_conteudo=26. 1989. Acesso em: 05/06/2020
- INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION - MEPC 48/2/1. INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION – IMO, 2002.
- INSTITUTO TRATA BRASIL. FREITAS, F. G.; MAGNABOSCO, A. L. Benefícios econômicos e sociais da expansão do saneamento no Brasil. 2018.
- INSTITUTO TRATA BRASIL. Principais estatísticas de coleta de esgoto. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/saneamento/principais-estatisticas/no-brasil/esgoto> Acessado em: 20/09/2019.
- ISO (International Organization for Standardization). **ISO Standard 15553:2006 Water Quality—Isolation and Identification of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts from Water.** International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2006.
- JARROLL, E. L.; HOFF, J. C. Effect of disinfectants on *Giardia* cysts. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 18, n. 1, p. 1-28, 1988.
- 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.

- KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of water and health**, v. 5, n. 1, p. 1-38, 2007.
- KHAN, A.; SHAIK, J. S.; GRIGG, M. E. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. **Acta tropica**, v. 184, p. 1-14, 2018.
- KIFLEYOHANNES, T.; ROBERTSON, L. J. Preliminary insights regarding water as a transmission vehicle for *Cryptosporidium* and *Giardia* in Tigray, Ethiopia. **Food and Waterborne Parasitology**, p. e00073, 2020.
- KING, P., TYLER, K.M., HUNTER, P.R. Anthroponotic transmission of *Cryptosporidium parvum* predominates in countries with poorer sanitation: a systematic review and meta-analysis. **Parasitol. Vectors** 12, 16, 2019.
- KOEHLER, A.V., JEX, A.R., HAYDON, S.R., STEVENS, M.A., GASSER, R.B., 2014. *Giardia*/giardiasis—a perspective on diagnostic and analytical tools. **Biotechnol. Adv.** 32, 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.
- KORICH, D. G. MEAD, J. R., MADORE, M. S., SINCLAIR, N. A., & STERLING, C. R. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 5, p. 1423-1428, 1990.
- KOTLOFF K. L., NATARO J.P., BLACKWELDER W.C. 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, 2013.
- KUCIK, C. J.; MARTIN, G. L.; SORTOR, B. V. Common intestinal parasites. **American family physician**, v. 69, n. 5, p. 1161-1168, 2004.
- KUHN, R. C., ROCK, C. M., OSHIMA, K. H. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild ducks along the Rio Grande River valley in southern New Mexico. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 1, p. 161-165, 2002.
- LADEIRO, M. P.; BIGOT, A.; AUBERT, D.; HOHWEYER, J.; FAVENNEC, L.; VILLENA, I.; GEFFARD, A. Protozoa interaction with aquatic invertebrate: interest for watercourses biomonitoring. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 2, p. 778-789, 2013.
- LAFFERTY, K. D. The ecology of climate change and infectious diseases. **Ecology**, v. 90, n. 4, p. 888-900, 2009.
- LAL, A., BAKER, M. G., HALES, S., FRENCH, N. P. Potential effects of global environmental changes on cryptosporidiosis and giardiasis transmission. **Trends in parasitology**, v. 29, n. 2, p. 83-90, 2013.
- LASEK-NESSELQUIST, E.; BOGOMOLNI, A. L., GAST, R. J., WELCH, D. M., ELLIS, J. C., SOGIN, M. L., MOORE, M. J. Molecular characterization of *Giardia intestinalis* haplotypes in marine animals: variation and zoonotic potential. **Diseases of aquatic organisms**, v. 81, n. 1, p. 39-51, 2008.

- 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. **Journal of Water and Health**, 6: 527-532, 2008.
- LEAL, D. A. G. Avaliação da contaminação de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) por espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* em um ambiente de estuário do litoral de São Paulo. 2008. **Dissertação (Mestrado em Parasitologia)** - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 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, 2013.
- LEAL, D. A. G. Monitoramento de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. na cadeia produtiva de ostras (*Crassostrea brasiliiana*), depuradas para o consumo humano no complexo estuário - lagunar de Cananéia, São Paulo. **Tese (Doutorado em Parasitologia)** - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2013.
- LEAL, D. A. G.; SOUZA, D. S. M.; CAUMO, K. S.; FONGARO, G.; PANATIERI, L. F.; DURIGAN, M., FRANCO, R. M. B. Genotypic characterization and assessment of infectivity of human waterborne pathogens recovered from oysters and estuarine waters in Brazil. **Water Research**, v.137, p.273-280, 2018a.
- LEAL, D. A. G.; SCHERER, G. S.; MOREIRA, N. M. Avaliação microbiológica da água para consumo humano em fronteira brasileira – Foz do Iguaçu. In: **4º Congresso Paranaense de Saúde Pública / Coletiva**. Curitiba, Paraná, 2018b.
- LEAV, B. A. MACKAY, M. R., ANYANWU, A., O'CONNOR, R. M., CEVALLOS, A. M., KINDRA, G., WARD, H. D. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. **Infection and immunity**, v. 70, n. 7, p. 3881-3890, 2002.
- LEUNG, A. K., LEUNG, A. A., WONG, A. H., SERGI, C. M., KAM, J. K. Giardiasis: an overview. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 13, n. 2, p. 134-143, 2019.
- LIM, F. Y.; ONG, S. L.; HU, J. Recent advances in the use of chemical markers for tracing wastewater contamination in aquatic environment: a review. **Water**, v. 9, n. 2, p. 143, 2017.
- LIPP, E. K., KURZ, R., VINCENT, R., RODRIGUEZ-PALACIOS, C., FARRAH, S. R., ROSE, J. B. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. **Estuaries**, v. 24, n. 2, p. 266-276, 2001a.
- LIPP, E. K., FARRAH, S. A., ROSE, J. B. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. **Marine pollution bulletin**, v. 42, n. 4, p. 286-293, 2001b.
- LITLESKARE, S. RORTVEIT, G., EIDE, G. E., HANEVIK, K., LANGELAND, N., WENSAAS, K. A. Prevalence of irritable bowel syndrome and chronic fatigue 10 years

- after *Giardia* infection. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 7, p. 1064-1072. e4, 2018.
- LOPES, L. M. N. O rompimento da barragem de Mariana e seus impactos socioambientais. **Sinapse Múltipla**, v. 5, n. 1, p. 1, 2016.
- LOPES, M. C. Cultura Política no Litoral do Paraná. **Revista NEP-Núcleo de Estudos Paranaenses da UFPR**, v. 3, n. 1, p. 1-16, 2017.
- LORENZO-MORALES, J. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. **Parasitology research**, v. 95, n. 4, p. 273-277, 2005.
- LYU, Z., SHAO, J., XUE, M., YE, O., CHEN, B., QIN, Y., WEN, J. A new species of *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcomastigophora: Hexamitidae) in hamsters. **Parasitol. Vectors** 11, 202, 2018.
- MADADI, S., MAHAMI-OSKOEI, M., RAFEEY, M., SPOTIN, A., AMINISANI, N., MAHAMI-OSKOEI, L., BERAHMAT, R. Comparative evaluation of *Cryptosporidium* infection in malnourished and well-nourished children: Parasitic infections are affected by the interaction of nutritional status and socio-demographic characteristics. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 68, p. 101406, 2020.
- MAHMOUDI, M.; ONGERTH, J. E.; KARANIS, P. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis: the Asian perspective. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 220, n. 7, p. 1098-1109, 2017.
- MAHMOUDI, M. R. Molecular detection and characterization of *Cryptosporidium* spp. in the sewage-contaminated rivers entering Bandar-e Anzali Lagoon in Guilan Province, Iran. **Journal of Advances in Environmental Health Research**, 2020.
- MACKENZIE, W. R. HOXIE, N. J., PROCTOR, M. E., GRADUS, M. S., BLAIR, K. A., PETERSON, D. E., DAVIS, J. P. Massive waterborne outbreak of *Cryptosporidium* infection associated with a filtered public water supply, Milwaukee, Wisconsin, March and April 1993. **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 3, p. 161-167, 1994.
- MAGANA-ORDORICA, D., MENA, K., 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. **Journal of water and health**, v. 8, n. 4, p. 797-802, 2010.
- 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.
- MILLER, W. A., ATWILL, E. R., GARDNER, I. A., MILLER, M. A., FRITZ, H. M., HEDRICK, R. P., CONRAD, P. A. 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.

MASANGKAY, F. R., MILANEZ, G. D., TSIAMI, A., SOMSAK, V., KOTEPUI, M., TANGPONG, J., & KARANIS, P. First report of *Cryptosporidium hominis* in a freshwater sponge. **Science of the Total Environment**, v. 700, p. 134447, 2020.

MSMT, F. R. M. R. Increased Detection of *Cryptosporidium* and *Cyclospora* spp. Oocysts in a Major Philippine Watershed Following Rainfall Events. **Asian Journal of Biological and Life Sciences**, v. 8, n. 3, p. 111, 2019.

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.

NASSER, A. M., VAIZEL-OHAYON, D., AHARONI, A., REVHUN, M. Prevalence and fate of *Giardia* cysts in wastewater treatment plants. **Journal of applied microbiology**, v. 113, n. 3, p. 477-484, 2012.

NAKAZATO, G. GYLES, C., ZIEBELL, K., KELLER, R., TRABULSI, L. R., GOMES, T. A. T., DE CASTRO, A. P. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Veterinary microbiology**, v. 101, n. 4, p. 269-277, 2004.

NGUYEN, K.H.; SENAY, C.; YOUNG, S.; NAYAK, B.; LOBOS, A.; CONRAD, J.; HARWOOD, V.J. Determination of wild animal sources of fecal indicator bacteria by microbial source tracking (MST) influences regulatory decisions. **Water Res.** 144, 424–434, 2018.

NISHI, L., BERGAMASCO, R., TOLEDO, M. J. D. O., FALAVIGNA, D. L. M., GOMES, M. L., MOTA, L. T., FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in the Ivaí indigenous land, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 5, p. 543-547, 2009.

NYGÅRD, K. S., B., SØBSTAD, Ø., WALDE, A., TVEIT, I., LANGE LAND, N., AAVITSLAND, P. A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a non-endemic urban area. **BMC public health**, v. 6, n. 1, p. 141, 2006.

OKHUYSEN, P. C., WHITE JR, A. C. Parasitic infections of the intestines. **Current opinion in infectious diseases**, v. 12, n. 5, p. 467-472, 1999.

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.

OMS. Water-related diseases. Disponível em: https://www.who.int/water_sanitation_health/diseases-risks/diseases/diarrhoea/en/. Acesso em: 25/03/2020

ONU. Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável. 2015. Disponível em: <http://www.br.undp.org/content/dam/brazil/docs/agenda2030/undp-br-Agenda2030-completo-pt-br-2016.pdf>. Acesso em: 20 set. 2019.

ORTEGA-PIERRES, G. (Ed.). *Giardia and Cryptosporidium: from molecules to disease*. CABI, 2009.

ORTEGA, C. SOLO-GABRIELE, H. M., ABDELZAHER, A., WRIGHT, M., DENG, Y., STARK, L. M. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 9, p. 1374-1381, 2009.

ORTEGA-PIERRES, M. G., JEX, A. R., ANSELL, B. R., SVÄRD, S. G. Recent advances in the genomic and molecular biology of *Giardia*. **Acta tropica**, v. 184, p. 67-72, 2018.

PACHEPSKY, Y.; SHELTON, D.; DORNER, S.; WHELAN, G. Can *E. coli* or thermotolerant coliform concentrations predict pathogen presence or prevalence in irrigation waters?. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 3, p. 384-393, 2016.

PAULINO, G. V. B., FÉLIX, C. R., SILVAN, C. G., ANDERSEN, G. L., LANDELL, M. F. Bacterial community and environmental factors associated to rivers runoff and their possible impacts on coral reef conservation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 156, p. 111233, 2020.

PALLER, V. G., KIM, P. M., ABADILLA, M. E., BORDADO, A. M., GALAPON, M., GAMALO, L. E., MACALINAO, C. A. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in selected recreational pools in Calamba, Laguna, Philippines. **Eco Env Cons**, v. 23, p. 1945-1951, 2017.

PALM, D. malin weiland a, andrew g. mcarthur b, jadviga winiecka-krusnell c, michael j. cipriano b, shanda r. birkeland b, sarah e. pacocha d, barbara davids e, frances gilllin e, ewert linder c, staffan svarð. Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 141, n. 2, p. 199-207, 2005.

PARADELLA, T. C., KOGA-ITO, C. Y. E JORGE, A. O. C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas, Revista de Odontologia da UNESP, 36, pp. 163-168, 2007.

PARANÁ. Meio Ambiente. Erosão e Progradação do Litoral Brasileiro–Paraná. **Brasília: MMA**, 2006.

PARANÁ TURISMO, SECRETARIA DO DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL. Turismo em números 2018 (Anos base: 2014 – 2018), 2019.

PASQUIER, M.-C. Gertrude Stein, l'écriture et l'exil. **Temps (Les) Modernes Paris**, v. 37, n. 417, p. 1816-1834, 1981.

PASSARINHO, N. Tragédia com barragem da Vale em Brumadinho pode ser a pior no mundo em 3 décadas. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-47034499>. Acessado em: 01/03/2020.

PEARCE, D. G. **Tourist development**. Longman Group Limited. 1981.

PEREIRA, A. Q.; DANTAS, E. W. C.; GOMES, I. R. Lazer na praia: segunda residência e imobiliário turístico no Nordeste. 2016.

PINEDA, C. O., LEAL, D. A. G., FIUZA, V. R. S., JOSE, J., BORELLI, G., DURIGAN, M., PENA, H. F. J., FRANCO, R. M. B. *Toxoplasma gondii* oocysts,

Giardia cysts and *Cryptosporidium* oocysts in outdoor swimming pools in Brazil. **Zoonoses and Public Health**. 2020. *In Press*.

PINTO, K. C., LAURETTO, M. S., GONZALEZ, M. I. J. N., SATO, M. I. Z., NARDOCCI, A. C., RAZZOLINI, M. T. P. Assessment of health risks from recreational exposure to *Giardia* and *Cryptosporidium* in coastal bathing waters. **Environmental Science and Pollution Research**, 27, 1-12, 2020.

PORTUGAL. Ministério do Ambiente, diário da república — i série-a, Decreto-Lei n.º 236/98. 1998.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. **Water research**, v. 101, p. 318-332, 2016.

POLLEY, L., HOBERG, E., KUTZ, S. Climate change, parasites and shifting boundaries. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1, p. 1-5, 2010.

PONTIUS, F. W. & American Water Works Association. Water quality and treatment: a handbook of community water supplies. In: **Water quality and treatment: a handbook of community water supplies**. AWWA, 1990.

PIYAMONGKOL, W., BERMÚDEZ, M. G., HARPER, J. C., WELLS, D. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. **Molecular Human Reproduction**, v. 9, n. 7, p. 411-420, 2003.

RAMO, A., QUÍLEZ, J., MONTEAGUDO, L., DEL CACHO, E., SÁNCHEZ-ACEDO, C. Intra-species diversity and panmictic structure of *Cryptosporidium parvum* populations in cattle farms in Northern Spain. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0148811, 2016.

RAZZOLINI, M. T. P., BRETERNITZ, B. S., KUCHKARIAN, B., BASTOS, V. K. *Cryptosporidium* and *Giardia* in urban wastewater: A challenge to overcome. **Environmental Pollution**, v. 257, p. 113545, 2020.

RENDTORFF, R. C. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. **American journal of hygiene**, v. 59, n. 2, p. 209-20, 1954.

RIBEIRO, L., CRUZ, M. M. Saiba quais são as impurezas da lama da barragem de Brumadinho e os riscos à saúde. Disponível em: https://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2019/01/30/interna_gerais,1026007/saiba-quais-sao-as-impurezas-da-lama-de-brumadinho-e-os-riscos-a-saude.shtml. Acessado em: 03/03/2020.

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

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

ROBERTSON, L. J. FORBERG, T., HERMANSEN, L., HAMNES, I. S., GJERDE, B. *Giardia duodenalis* cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: genetic

- characterization by PCR-RFLP and sequence analysis at two genes. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 4, p. 576-585, 2007.
- ROSE, J. B., GERBA, C. P., JAKUBOWSKI, W. Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Environmental Science & Technology**, v. 25, n. 8, p. 1393-1400, 1991.
- 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.
- ROWE, D. W. SPRAGUE, J. B., HEMING, T. A., BROWN, I. T. Sublethal effects of treated liquid effluent from a petroleum refinery. II. Growth of rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 3, n. 2, p. 161-169, 1983.
- RYAN, U.; POWER, M. *Cryptosporidium* species in Australian wildlife and domestic animals. **Parasitology**, v. 139, n. 13, p. 1673-1688, 2012.
- RYAN, U.; CACCIÒ, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. **International journal for parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 943-956, 2013.
- RYAN U., FAYER R., XIAO L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**. 2014;141:1667–85, 2014.
- RYAN, U, PAPARINI, A., MONIS, P., & HIJAWI, N. It's official—*Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? **Water Research**, v. 105, p. 305-313, 2016.
- RYAN, U., HIJAWI, N., FENG, Y., XIAO, L. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. **International journal for Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 1-11, 2019.
- RUIZ, F; ABAD, M.; BODERGAT, A. M.; CARBONEL, P.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, J.; YASUHARA, M. Marine and brackish-water ostracods as sentinels of anthropogenic impacts. **Earth-Science Reviews**, v. 72, n. 1-2, p. 89-111, 2005.
- ROSADO-GARCÍA, F. M. GUERRERO-FLÓREZ, M., KARANIS, G., HINOJOSA, M. D. C., & KARANIS, P. Water-borne protozoa parasites: the Latin American perspective. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 220, n. 5, p. 783-798, 2017.
- ROSENTHAL, J. Climate change and the geographic distribution of infectious diseases. **Ecohealth**, v. 6, n. 4, p. 489-495, 2009.
- ROSSELLÓ, J., SANTANA-GALLEGO, M., AWAN, W. Infectious disease risk and international tourism demand. **Health policy and planning**, v. 32, n. 4, p. 538-548, 2017.
- SALES, T.E.A. Estudo da Balneabilidade das Praias Urbanas no Município de Natal-RN durante o ano de 2005. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária)** - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.
- SCHERER, G. S. Avaliação parasitológica, microbiológica e físico-química da água destinada ao consumo humano em um município de tríplice fronteira – Brasil, Paraguai e Argentina. **Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)** – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Foz do Iguaçu, Paraná, 2019.
- SCHETS, F. M., VAN DEN BERG, H. H., ENGELS, G. B., LODDER, W. J., DE RODA HUSMAN, A. M. *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-

commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, The Netherlands. **International journal of food microbiology**, v. 113, n. 2, p. 189-194, 2007.

SHAPIRO, K., MILLER, W. A., SILVER, M. W., ODAGIRI, M., LARGIER, J. L., CONRAD, P. A., MAZET, J. A. Research commentary: association of zoonotic pathogens with fresh, estuarine, and marine macroaggregates. **Microbial ecology**, v. 65, n. 4, p. 928-933, 2013.

SILVA, S. O., RICHTZENHAIN, L. J., BARROS, I. N., GOMES, A. M., SILVA, A. V., KOZERSKI, N. D., SOARES, R. M. A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 3, p. 551-557, 2013.

SILVA, C. V. O., DE OLIVEIRA, A. M. A., BEZERRA, P. P. N., EVANGELISTA, J. N. B. *Escherichia coli* na suinocultura. Aspectos clínicos. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 2, p. 288-293, 2015.

SILVA, T. C. Biomonitoramento da água na sub-bacia hidrográfica do rio Poxim, Sergipe. 2017.

SARKAR, R. TATE, J. E., AJJAMPUR, S. S., KATTULA, D., JOHN, J., WARD, H. D., & KANG, G.. Burden of diarrhea, hospitalization and mortality due to cryptosporidial infections in Indian children. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e3042, 2014.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO (SNIS). Diagnóstico dos Serviços de água e esgotos – 2017. **Disponível em:** <<http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2017>> > Acesso em: 22 set. 2019.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO (SNIS) Disponível em: <http://www.snis.gov.br/diagnostico-anual-agua-e-esgotos/diagnostico-dos-servicos-de-agua-e-esgotos-2018> 2018. Acesso em 03/02/2020

SMITH, H. V. CACCIO, S. M., COOK, N., NICHOLS, R. A. B., TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary parasitology**, v. 149, n. 1-2, p. 29-40, 2007.

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

SOUZA, D. S. M., PIAZZA, R. S., PILOTTO, M. R., NASCIMENTO, M. D. A., MORESCO, V., TANIGUCHI, S., SASAKI, S. T. Virus, protozoa and organic compounds decay in depurated oysters. **International journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 3, p. 337-345, 2013.

SOBA, B.; LOGAR, J. Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. **Parasitology**, v. 135, n. 11, p. 1263-1270, 2008.

SOLLER, J.A.; SCHOEN, M.E.; VARGHESE, A.; ICHIDA, A.M.; BOEHM, A.B.; EFTIM, S.; ASHBOLT, N.J.; RAVENSCROFT, J.E. Human health risk implications of

multiple sources of faecal indicator bacteria in a recreational waterbody. **Water Res.** 2014, 66, 254–264.

SQUIRE, S. A., RYAN, U. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 195, 2017.

SQUIRE, S. A., YANG, R., ROBERTSON, I., AYI, I., RYAN, U. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in farmers and their ruminant livestock from the Coastal Savannah zone of Ghana. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 55, p. 236-243, 2017.

SULAIMAN, I M. FAYER, R., BERN, C., GILMAN, R. H., TROUT, J. M., SCHANTZ, P. M.; XIAO, L.. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 11, p. 1444, 2003.

SRISUPHANUNT, M., KARANIS, P., CHAROENCA, N., BOONKHAO, N., ONGERTH, J. E. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in environmental waters of southwest coastal areas of Thailand. **Parasitology research**, v. 106, n. 6, p. 1299-1306, 2010.

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.

THOMPSON, RC A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1259-1267, 2000.

THOMPSON, R. A., OLSON, M. E., ZHU, G., ENOMOTO, S., ABRAHAMSEN, M. S., & HIJJAWI, N. S. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. **Advances in parasitology**, v. 59, p. 77-158, 2005.

THOMPSON, R.C. A.; MONIS, P. *Giardia*—from genome to proteome. In: **Advances in parasitology**. Academic Press, 2012. p. 57-95.

THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections—What's new? **Infection, Genetics and Evolution**, p. 103951, 2019.

TANIGUCHI, Y., YASUTAKA, S., KOMINAMI, R., SHINOHARA, H. Proliferation and differentiation of thyrotrophs in the pars distalis of the rat pituitary gland during the fetal and postnatal period. **Anatomy and embryology**, v. 203, n. 4, p. 249-253, 2001.

TEDDE, T., MARANGI, M., PAPINI, R., SALZA, S., NORMANNO, G., VIRGILIO, S., GIANCASPERO, A. *Toxoplasma gondii* and other zoonotic protozoans in Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and blue mussel (*Mytilus edulis*): a food safety concern? **Journal of food protection**, v. 82, n. 3, p. 535-542, 2019.

TOURON, A., BERTHE, T., GARGALA, G., FOURNIER, M., RATAJCZAK, M., SERVAIS, P., & PETIT, F. Assessment of faecal contamination and the relationship between pathogens and faecal bacterial indicators in an estuarine environment (Seine, France). **Marine pollution bulletin**, v. 54, n. 9, p. 1441-1450, 2007.

TRATA BRASIL. Esgoto, 2019. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/saneamento/principais-estatisticas/no-mundo/esgoto>. Acessado em: 22/03/2020

TRATA BRASIL. Curitiba, 2019. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/curitiba-e-melhor-capital-do-pais-em-saneamento-basico>. Acessado em: 15/02/2020.

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

UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância). In 2017, four out of ten people used safely managed sanitation services. Disponível em: <https://data.unicef.org/topic/water-and-sanitation/sanitation/>. Acessado em: 05/03/2020.

UNITED NATIONS. **17 Sustainable Development Goals**. Disponível em: <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld>. Acessado em: 20/01/2020.

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.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Environmental Protection Agency**. 2003.

VISVESVARA, GOVINDA S.; DICKERSON, JENNIFER W.; HEALY, GEORGE R. Variable infectivity of human-derived *Giardia lamblia* cysts for Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 837-841, 1988.

VIVANCOS, V., GONZÁLEZ-ALVAREZ, I., BERMEJO, M., GONZALEZ-ALVAREZ, M. Giardiasis: characteristics, pathogenesis and new insights about treatment. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 1287-1303, 2018.

XIAO, L., MORGAN, U. M., LIMOR, J., ESCALANTE, A., ARROWOOD, M., SHULAW, W., LAL, A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3386-3391, 1999.

XIAO, L. SINGH, A., LIMOR, J., GRACZYK, T. K., GRADUS, S., LAL, A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 3, p. 1097-1101, 2001.

XIAO L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Exp Parasitol.** 24:80–9, 2010.

XIAO, L.; FENG, Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 8, p. 14-32, 2017.

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.

ZAPATA, F., PERKINS, M. E., RIOJAS, Y. A., WU, T. W., LE, S. B. The *Cryptosporidium parvum* ABC protein family. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 120, n. 1, p. 157-161, 2002.

ZHOU, L.; FAYER, R., TROUT, J. M., RYAN, U. M., SCHAEFER, F. W., & XIAO, L. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 12, p. 7574-7577, 2004.

WANDERLEY, L. J., MANSUR, M. S., MILANEZ, B., & PINTO, R. G. Desastre da Samarco/Vale/BHP no Vale do Rio Doce: aspectos econômicos, políticos e socio ambientais. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 3, p. 30-35, 2016.

WANG, R. J., LI, J. Q., CHEN, Y. C., ZHANG, L. X., XIAO, L. H. Widespread occurrence of *Cryptosporidium* infections in patients with HIV/AIDS: Epidemiology, clinical feature, diagnosis, and therapy. **Acta tropica**, v. 187, p. 257-263, 2018.

WANG, Y., GONZALEZ-MORENO, O., ROELLIG, D. M., OLIVER, L., HUGUET, J., GUO, Y., XIAO, L. Epidemiological distribution of genotypes of *Giardia duodenalis* in humans in Spain. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 432, 2019.

WATKINS, R. R., ECKMANN, L. Treatment of giardiasis: current status and future directions. **Current infectious disease reports**, v. 16, n. 2, p. 396, 2014.

WEISKERGER, C. J. BRANDÃO, J., AHMED, W., ASLAN, A., AVOLIO, L., BADGLEY, B. D., JORDAO, L. Impacts of a changing earth on microbial dynamics and human health risks in the continuum between beach water and sand. **Water Research**, v. 162, p. 456-470, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for safe recreational water environments: Coastal and fresh waters**. World Health Organization, 2003.

WILKS, J., OLDENBURG, B. Tourist health: The silent factor in customer service. **Australian Journal of Hospitality Management**, v. 2, n. 2, p. 13-23, 1995.

WILKES, G. EDGE, T., GANNON, V., JOKINEN, C., LYAUTEY, E., MEDEIROS, D., LAPEN, D. R. Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. **Water Research**, v. 43, n. 8, p. 2209-2223, 2009.

WILSON, M. E., CHEN, L. H., HAN, P. V., KEYSTONE, J. S., CRAMER, J. P., SEGURADO, A., LEDER, K. Illness in travelers returned from Brazil: the GeoSentinel experience and implications for the 2014 FIFA World Cup and the 2016 Summer Olympics. **Clinical infectious diseases**, v. 58, n. 10, p. 1347-1356, 2014.

WYER, M. D., WYN-JONES, A. P., KAY, D., AU-YEUNG, H. K. C., GIRONÉS, R., LÓPEZ-PILA, J., Schneider, O. Relationships between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational waters. **Water research**, v. 46, n. 13, p. 4130-4141, 2012.

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, 2011.

9. ANEXOS

9.1 Parceria firmada entre o Laboratório de Parasitologia Ambiental da UFPR e o Instituto Ambiental do Paraná (IAP).



OFICIO N.º 009/2016 - IAP/DIMAP

Curitiba, 18 de Fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Patologia Básica
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Centro Politécnico - Caixa Postal 19031
CEP 81531-990 - CURITIBA/PR

Ref.: Proposta de Parceria em Projeto de Pesquisa

Prezado Senhor,

Em atenção a correspondência datada de 15/02/2016, referente ao projeto de pesquisa intitulado: MONITORAMENTO AMBIENTAL DE PARASITOS NO LITORAL DO PARANÁ COMO INSTRUMENTO PARA ELABORAÇÃO DE PROPOSTA DE LEGISLAÇÃO ESTADUAL DE BALNEABILIDADE, informamos que temos interesse em participar do mesmo, no que se refere à realização das análises microbiológicas de rotina.

Salientamos que o referido projeto é de interesse para esta instituição tendo em vista a necessidade de elaboração de legislação estadual referente a critérios e padrões, não contemplados pela legislação do CONAMA 274/2000, para a classificação de águas para fins recreacionais e balneabilidade, especificamente no que se refere a detecção de enteropatógenos humanos - protozoários patogênicos *Giardia* e *Cryptosporidium* - causadores de gastroenterite, bem como, quanto a qualidade da areia de algumas praias do litoral quanto à contaminação por geohelmintos e outros de caráter zoonótico que ocasionam patologias em seres humanos.

Sem mais para o momento, colocamo-nos à disposição para os esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente


Ivonete Coelho da Silva Chaves
Diretora da DIMAP

Rua Eng Rebouças, 1206 - Rebouças 80215-100 - Curitiba - Paraná - Brasil
Fone: 41 3213-3700 Fax: 41 3333-6161 www.iap.pr.gov.br

9.2 Produtos decorrentes da Dissertação de Mestrado

