

Universidade Federal de Pelotas
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia



**Ocorrência de protozoários zoonóticos em animais silvestres e águas brutas
no contexto de saúde única no Sul do estado do Rio Grande do Sul**

Willian Cardoso Ferreira Zorrer

Pelotas, 2025

Willian Cardoso Ferreira Zorrer

**Ocorrência de protozoários zoonóticos em animais silvestres e águas brutas
no contexto de saúde única no Sul do estado do Rio Grande do Sul**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia e
Parasitologia do Instituto de Biologia da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (área de
concentração: Parasitologia)

Orientador: Prof. Dr. Fabio Raphael Pascoti Bruhn

Co-Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Casquero Cunha

Pelotas, 2025

Willian Cardoso Ferreira Zorrer

Ocorrência de protozoários zoonóticos em animais silvestres e águas brutas no contexto de saúde única no Sul do estado do Rio Grande do Sul

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 01/10/2025

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Nathalia Berne Pinheiro (Representante do Colegiado do PPGMPar)
Doutora em Ciências Biológicas (Parasitologia) pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof^a. Dr^a. Nathieli Bianchin Bottari (Coordenadora Adjunta do PPGMPar)
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria

Doutora Natália Machado Rahal
Doutora em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Doutor Pedro Machado Medeiros de Albuquerque
Doutor em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Equipe de Acompanhamento:

Willian Cardoso Ferreira Zorrer

Biomédico, Universidade do Sul de Santa Catarina, UNISUL, Brasil, 2024. Dicente do mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Mestrando.

Fábio Raphael Pascoti Bruhn

Médico Veterinário, Doutor, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Brasil, 2015.

Professor adjunto da disciplina de Epidemiologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), vinculado ao Departamento de Veterinária Preventiva da Faculdade de Veterinária. Orientador.

Rodrigo Casquero Cunha

Médico Veterinário, Doutor, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Brasil, 2013. Professor Adjunto da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), vinculado ao Departamento de Veterinária Preventiva da Faculdade de Veterinária. Coorientador.

Kauê Rodriguez Martins

Biólogo, Doutor, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Brasil, 2018. Pós-Doutorando na Universidade Federal de Pelotas (UFPel) na área de Fisiopatologia e diagnóstico laboratorial. Laboratório de Biologia Molecular Veterinário. Colaborador.

Natália Machado Rahal

Médica Veterinária, Doutora, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Brasil, 2023. Pós-Doutoranda no Programa de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Laboratório de Biologia Molecular Veterinário. Colaboradora.

Pedro Machado Medeiros de Albuquerque

Biotecnologista, Doutor em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil, 2025. Pós-Doutorando em projeto de desenvolvimento de uma vacina de subunidade recombinante contra o parasita na Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Laboratório de Biologia Molecular Veterinário. Colaborador.

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo suporte incondicional às aventuras e desventuras que a trajetória acadêmica nos proporciona, não medindo esforços para acompanhar e apoiar meu crescimento pessoal e profissional.

À Universidade Federal de Pelotas, por possibilitar a experiência de aperfeiçoamento profissional. Ao Laboratório de Biologia Molecular Veterinário desta casa, em especial aos pesquisadores Kauê Rodriguez Martins, Natalia Machado Rahal e Pedro Machado Medeiros de Albuquerque que, guiaram muitas das ideias que se concretizaram neste trabalho. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, a todos professores e colegas, que atravessaram minha trajetória com ensinamentos. Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento por meio de uma bolsa de estudos, que permitiu me dedicar de forma integral a esta pesquisa.

Agradecimento aos colegas Gustavo Cardoso Ferreira Klann, Bibiana Rodrigues de Freitas e Estefani Rinaldi, Pedro Gabriel de Oliveira que colaboraram nas aventuras de coletas de campo e processamento de inúmeras amostras, fazendo possível o avanço desta pesquisa.

Agradecimento especial à Guilherme Almeida Lopes, por todo apoio emocional, escuta e palavras de encorajamento durante os meses finais do mestrado, ajudando a transformar os momentos atribulados em resiliência.

Aos meus orientadores, Profs. Fabio e Rodrigo, que conjuntamente me permitiram unir a epidemiologia e a biologia molecular, sendo mentores fundamentais e acreditando no potencial deste trabalho, mantendo suas portas abertas para o diálogo, fazendo sugestões e incentivando a tornar possível este projeto.

Resumo

Zorrer, Willian Cardoso Ferreira. **Ocorrência de protozoários zoonóticos em animais silvestres e águas brutas no contexto de saúde única no Sul do estado do Rio Grande do Sul.** 2025. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

Este estudo visa detectar a vigilância epidemiológica de patógenos zoonóticos, em animais silvestres no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Sua relevância está baseada nas estimativas de que mais de 60% dos patógenos humanos conhecidos são zoonóticos, sendo a investigação crucial devido ao aumento da interação interespécie causada por fatores como expansão urbana e mudanças climáticas. Investigou-se a ocorrência de patógenos zoonóticos de relevância em saúde pública — *Cryptosporidium* spp., *Cystoisospora* spp., *Giardia lamblia*, *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. — em animais silvestres e águas brutas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil, sob a perspectiva da Saúde Única como estratégica para a vigilância epidemiológica, assim como o entendimento dos reservatórios biológicos destes protozoários e a dinâmica dos mesmos. Foram analisadas amostras teciduais de animais silvestres atropelados, bem como águas superficiais de rios e córregos da microrregião de Pelotas, utilizando-se técnicas de diagnóstico molecular para identificar a presença dos protozoários. Os resultados revelaram uma prevalência elevada de *Trypanosoma cruzi* (80% dos animais analisados), abrangendo ampla diversidade de hospedeiros, incluindo mamíferos de diferentes nichos ecológicos e aves, evidenciando um ciclo enzoótico robusto com potencial de transbordamento para humanos e animais domésticos. Também foi detectada *Leishmania* spp. em indivíduos na Estação Ecológica Taim e na zona rural de Piratini-RS, localidades tradicionalmente consideradas de baixa prevalência para a leishmaniose, o que

sugere possível expansão geográfica do ciclo silvestre dessa doença no extremo sul do Brasil. Paralelamente, a detecção dos patógenos *Cystoisospora* spp. e *Giardia lamblia* foi contínua em todas as coletas. No entanto, sua ocorrência variou significativamente, mantendo-se entre 25% e 62,5% nos diferentes pontos de coleta. Esses achados, aliados à detecção de protozoários de transmissão hídrica (*Giardia lamblia* e *Cystoisospora* spp.) em fauna e em múltiplos pontos de águas brutas, reforçam a importância de integrar o monitoramento ambiental e da fauna na vigilância epidemiológica. O estudo fornece subsídios para a análise da distribuição geográfica de patógenos, a formulação de estratégias preventivas e de controle alinhadas aos princípios da Saúde Única, visando reduzir riscos à saúde humana e preservar a integridade dos ecossistemas.

Palavras-chave: saúde única; *Trypanosoma cruzi*; *Leishmania* spp.; animais silvestres; contaminação hídrica; *Cystoisospora* spp.; *Giardia lamblia*.

Abstract

Zorrer, Willian Cardoso Ferreira. **Occurrence of zoonotic protozoa in wild animals and raw water in the one health context in the South of Rio Grande do Sul State.** 2025. Dissertation (Master's in Biological Sciences) - Graduate Program in Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2025.

This study aims to deploy epidemiological surveillance for zoonotic pathogens in wild animals in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil. Its relevance is based on the estimate that more than 60% of known human pathogens are zoonotic, making investigation crucial due to increased interspecies interaction caused by factors like urban expansion and climate change. This study investigated the occurrence of zoonotic pathogens of public health relevance — *Cryptosporidium* spp., *Cystoisospora* spp., *Giardia lamblia*, *Leishmania* spp., and *Trypanosoma* spp.— in wild animals and raw water in the South of Rio Grande do Sul, Brazil. This was done under the One Health perspective as a strategy for epidemiological surveillance and for understanding the biological reservoirs and dynamics of these protozoa. Tissue samples from road-killed wild animals, as well as surface water from rivers and streams in the Pelotas microregion, were analyzed using molecular diagnostic techniques to identify the presence of the protozoa. The results revealed a high prevalence of *Trypanosoma cruzi* (80% of the analyzed animals), encompassing a wide diversity of hosts, including mammals from different ecological niches and birds. This highlights a robust enzootic cycle with the potential for spillover to humans and domestic animals. *Leishmania* spp. was also detected in animals at the Taim Ecological Station and in the rural area of Piratini-RS, localities traditionally considered of low prevalence for leishmaniasis. This suggests a possible

geographical expansion of the disease's sylvatic cycle in the extreme south of Brazil. Concurrently, the detection of *Cystoisospora* spp. and *Giardia lamblia* was continuous across all raw water collection points. However, their occurrence varied significantly, remaining between 25% and 62.5% across the different sites. These findings, combined with the detection of waterborne protozoa in both fauna and multiple raw water points, reinforce the importance of integrating environmental and faunal monitoring into epidemiological surveillance. The study provides critical data for analyzing the geographical distribution of pathogens, supporting the formulation of preventative and control strategies aligned with One Health principles, aiming to reduce risks to human health and preserve ecosystem integrity.

Keywords: one health; *Trypanosoma cruzi*; *Leishmania* spp.; wild animals; water contamination; *Cystoisospora* spp. ; *Giardia lamblia*.

Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição espacial e trechos rodoviários monitorados para coleta de fauna atropelada (Fevereiro–Agosto, 2025). O mapa ilustra o corredor rodoviário investigado no Sul do Rio Grande do Sul, delimitado pelas quilometragens das vias BR-293 (Km 0–153), BR-116 (Km 526–752), BR-392 (Km 67,8–111) e BR-471 (Km 526–530), além da Avenida Eliseu Maciel (BR-392) em Capão do Leão.....	26
Figura 2 – Mapa dos oito pontos de coleta de água bruta utilizados para a pesquisa na região de Pelotas, Sul do Rio Grande do Sul. Os pontos monitorados incluem arroios e canais de escoamento que desaguam na Lagoa dos Patos.....	27
Figura 3 – Distribuição da fauna silvestre coletada (n=25) em incidentes de atropelamento nas rodovias na Região Sul do RS. O gráfico ilustra a frequência absoluta das espécies que compõem o plantel monitorado.....	35
Figura 4: Caracterização físico-química dos pontos de coleta matutinas de água bruta em diferentes pontos da cidade de Pelotas-RS e em diferentes momentos do estudo, realizado entre Março e Agosto de 2025.....	42

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros moleculares e de eletroforese utilizados na detecção de protozoários e bactérias zoonóticas em amostras de água e fauna.....	33
Tabela 2 – Ocorrência e Prevalência de Protozoários Zoonóticos em Animais Silvestres Coletados no Sul do Rio Grande do Sul (Fevereiro–Agosto, 2025). Detalha-se o número absoluto (n) e a prevalência relativa (%) de protozoários zoonóticos detectados em 25 animais silvestres, assim como, a listagem das espécies hospedeiras parasitadas por cada agente.....	36
Tabela 3 – Ocorrência e Distribuição Espaço-Temporal de Patógenos em Águas Brutas. O quadro resume a detecção dos protozoários zoonóticos e <i>E. coli</i> por ponto de coleta, apresentando os resultados das coletas de monitoramento realizadas no período de março a agosto de 2025.	41

Lista de Abreviaturas

Sigla	Significado
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CD4	Cluster of Differentiation 4 (marcador de linfócitos T auxiliares)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (EUA)
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GPS	Sistema de Posicionamento Global
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
ITS	Internal Transcribed Spacer (Região Interna Transcrita do rDNA)
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MS	Ministério da Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PCR-RFLP	PCR com Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
rpm / RPM	Rotações por Minuto
RS	Rio Grande do Sul
SAS	Statistical Analysis System (software)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
SMX-TMP	Sulfametoxazol-Trimetoprima
STEC	Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i>

SSU	Small Subunit rRNA (Pequena Subunidade do RNA Ribossomal)
TBE	Tris-Borato-EDTA (Tampão usado em eletroforese)
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

Sumário

Equipe de Acompanhamento:.....	5
Agradecimentos.....	6
Resumo.....	7
Abstract.....	9
Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas.....	11
Lista de Abreviaturas.....	12
Sumário.....	14
1. Introdução.....	15
2. Revisão de Literatura.....	16
2.1 Saúde Única: Um Paradigma para a Saúde Pública Moderna.....	16
2.2 A Fauna Silvestre como Reservatório e Sentinelas.....	20
3 Objetivo Geral:.....	23
3.1 Objetivos Específicos:.....	23
4 Materiais e Métodos.....	24
4.1 Coleta e Processamento de Amostras de Animais Silvestres:.....	24
4.2 Coleta e Processamento de Amostras de Água:.....	26
4.3 Análise Molecular.....	27
4.3.1 Amostras de Sangue.....	27
4.3.2 Amostras de Tecido.....	28
4.3.3 Processamento de Amostras de Água Bruta e Extração de DNA.....	28
4.3.4 Quantificação e Análise de Pureza do DNA.....	29
4.3.5 Análise Molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	29
4.3.6 Processamento de Amostras por PCR e Análise por Eletroforese.....	32
4.4 Análise Estatística.....	33
5.1 Protozoários detectados em Animais Silvestres.....	34
5.1.1 Co-infecções na fauna silvestre.....	39
5.2 Patógenos em águas brutas.....	39
5.2.1 Influência de eventos pluviométricos.....	42
5.3 Integração dos achados e implicações para a Saúde Única.....	43
6 Manuscrito.....	47
7 Considerações Finais.....	58
8 Referências Bibliográficas.....	59
9 Materiais Suplementares.....	65
9.1 Plantel de animais silvestres coletados nas rodovias do Sul do Rio Grande do Sul, informando coordenadas e protozoários detectados.....	65

1. Introdução

A crescente inter-relação entre os domínios da saúde humana, animal e ambiental tem ressaltado a necessidade de abordagens interdisciplinares fundamentadas na perspectiva de Saúde Única. Essa visão integra os três âmbitos, evidenciando como fatores relacionados à urbanização desordenada, à degradação ambiental e às mudanças climáticas podem contribuir para a emergência e a disseminação de doenças zoonóticas. Dessa forma, o envolvimento colaborativo de múltiplas áreas do conhecimento é considerado essencial para enfrentar os desafios sanitários contemporâneos (Olivera, 2025; Alemán-Santos *et al.*, 2025).

Este trabalho buscou avaliar a dinâmica de protozoários patogênicos presentes na fauna silvestre, por meio do monitoramento em corredores rodoviários, focando, por exemplo, em potenciais ciclos enzoóticos envolvendo *Trypanosoma cruzi* e espécies de *Leishmania* spp.. Paralelamente, ao analisar a situação ambiental a partir de amostras de águas brutas, propõe-se a investigar a ocorrência de protozoários de transmissão feco-oral, como *Giardia lamblia* e *Cystoisospora* spp., que se configuram como objetos de pesquisa para a compreensão das fragilidades sanitárias relacionadas ao saneamento na região (Mewes *et al.*, 2025; Brentano *et al.*, 2015).

A estratégia de utilizar técnicas de diagnóstico molecular avançadas, aliada a estudos epidemiológicos, reforça a perspectiva de uma vigilância integrada e de uma atuação articulada entre as áreas de saúde pública, veterinária e ambiental (Olivera, 2025; Alemán-Santos *et al.*, 2025). Essa integração é vista como fundamental para a formulação de estratégias de controle que se adaptem às diversas dinâmicas de circulação dos patógenos, contribuindo para a identificação precoce de potenciais riscos e para a implementação de medidas preventivas que possam diminuir a vulnerabilidade das populações expostas (Melo *et al.*, 2024). Além disso, a consideração de aspectos ecológicos locais, como a situação das unidades de conservação, oferece subsídios importantes para compreender os possíveis caminhos de transmissão dos agentes patogênicos e reforça a necessidade de ações intersetoriais (Brentano *et al.*, 2015).

Em suma, a Saúde Única se apresenta como uma estratégia fundamental para a mitigação dos riscos associados às doenças zoonóticas, especialmente em contextos complexos como o observado no Sul do Rio Grande do Sul. Ao integrar dados oriundos do monitoramento animal e ambiental com avanços em técnicas diagnósticas, pretende-se fornecer uma avaliação da situação sanitária regional, evidenciando a necessidade de uma agenda pública para a elaboração de políticas públicas que promovam a vigilância, o saneamento e o manejo ambiental, e, consequentemente, contribuindo para uma saúde global sustentável (Olivera, 2025; Alemán-Santos *et al.*, 2025; Mewes *et al.*, 2025).

2. Revisão de Literatura

2.1 Saúde Única: Um Paradigma para a Saúde Pública Moderna

A abordagem de Saúde Única representa uma mudança de paradigma fundamental na forma como a ciência e a saúde pública encaram as doenças infecciosas. Superando a visão compartmentada que tradicionalmente separa a medicina humana da veterinária e da ecologia, este conceito se baseia na premissa irrefutável de que a saúde dos seres humanos está intrinsecamente e indissociavelmente ligada à saúde dos animais e à integridade dos ecossistemas que compartilhamos (RABINOWITZ *et al.*, 2013). Estima-se que mais de 60% das doenças infecciosas humanas conhecidas sejam de origem zoonótica, e que pelo menos 75% das doenças infecciosas emergentes em humanos, como a COVID-19, Ebola e a gripe aviária, tenham origem em animais (GEBREYES *et al.*, 2014). Este dado, por si só, sublinha a urgência de uma vigilância integrada e colaborativa.

Neste contexto, as doenças parasitárias zoonóticas assumem um papel de destaque. Agentes como protozoários e helmintos mantêm ciclos de vida complexos que frequentemente envolvem múltiplos hospedeiros e o ambiente como um componente crucial para sua transmissão. Em escala global, estas enfermidades afetam bilhões de pessoas, impondo um fardo pesado especialmente sobre populações em países em desenvolvimento, onde a triade de saneamento básico inadequado, acesso limitado à água potável e condições de higiene precárias cria um ambiente perpetuador para o ciclo de transmissão de inúmeros patógenos (SILVA, 2022; FONSECA *et al.*, 2014).

O Sul do Estado do Rio Grande do Sul, com sua matriz econômica fortemente ligada à agropecuária, extensas áreas rurais que se mesclam com centros urbanos em expansão e ecossistemas ricos em biodiversidade como o Pampa e a Mata Atlântica, constitui um cenário de particular interesse e risco para a circulação de zoonoses. A interface entre áreas de produção agrícola, fragmentos de mata nativa e cidades cria inúmeras oportunidades para o contato entre a fauna silvestre, animais domésticos e a população humana. É nesta interface que este projeto se propõe a investigar a dinâmica de patógenos, focando em três pilares interconectados da Saúde Única:

i. O Monitoramento da Fauna e os Riscos Emergentes: A Saúde Animal foi abordada através da vigilância de patógenos em animais silvestres. Esses animais desempenham um papel crucial, não apenas atuando como reservatórios que mantêm os agentes infecciosos ativos na natureza, mas também funcionando como sentinelas biológicas. As infecções detectadas neles são indicadores iniciais que podem sinalizar riscos emergentes ou a expansão geográfica de doenças que ameaçam outras espécies, incluindo os seres humanos.

ii. Águas Brutas como Espelho da Contaminação: O componente da Saúde Ambiental foi investigado pela análise da qualidade das fontes de águas brutas. Essas fontes agem como um espelho da contaminação ambiental da região e representam um vetor crítico para a transmissão de patógenos feco-orais para as comunidades. O monitoramento contínuo destas águas é essencial para compreender a disseminação de protozoários e orientar medidas de saneamento e tratamento.

iii. O Foco Final e a Determinação da Exposição: O componente final e principal foco de preocupação é a Saúde Humana. A exposição e o risco para a população são determinados diretamente pela intersecção dos dois primeiros fatores: a contaminação ambiental, refletida nas fontes hídricas, e a proximidade com os robustos ciclos de transmissão que envolvem a fauna local e doméstica. É através desta visão integrada que se pode medir a vulnerabilidade real da comunidade.

A qualidade da água é um pilar fundamental para a saúde pública, uma vez que o acesso a recursos hídricos seguros é imperativo para a prevenção de doenças de origem hídrica (JUNIOR *et al.*, 2021; DIAS *et al.*, 2008). Nesse contexto, a contaminação dos mananciais por dejetos humanos e animais configura-se como uma das principais vias de transmissão para uma ampla gama de patógenos entéricos. Essa contaminação ocorre por meio de descargas diretas de esgoto sem tratamento adequado ou pelo escoamento que transporta resíduos orgânicos a partir de áreas urbanas e rurais (DIAS *et al.*, 2008).

Entre os agentes patogênicos, os protozoários ganham destaque, considerando sua elevada resistência a métodos convencionais de desinfecção e sua baixa dose infecciosa. Estudos têm enfatizado a relevância da detecção de *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* spp. em amostras de água, evidenciando o risco

que esses organismos representam para a saúde humana, inclusive em situações em que há fácil acesso a mananciais contaminados (JUNIOR *et al.*, 2021; DIAS *et al.*, 2008). Ademais, a presença de *Cystoisospora* spp. em ambientes impactados pela deposição de dejetos animais, especialmente em áreas onde a coleta e o manejo destes resíduos não são realizados de forma adequada, reforça o risco de transmissão via água. Nesse aspecto, iniciativas voltadas à conscientização quanto ao destino adequado dos dejetos fecais de animais, como demonstrado por Nardo (2013), são essenciais para diminuir a dispersão destes agentes e proteger a saúde pública. Portanto, a integridade dos mananciais é diretamente influenciada por práticas de manejo de resíduos e saneamento básico, sendo a implementação de medidas preventivas e o monitoramento contínuo estratégias indispensáveis para garantir a qualidade da água e mitigar riscos à saúde da população.

A infecção por *Giardia lamblia* é considerada uma das parasitoses intestinais mais comuns em todo o mundo. A análise molecular revelou que *G. lamblia* é um complexo de pelo menos oito genótipos (Assemblages A a H). Os Assemblages A e B são os mais importantes em saúde pública, pois infectam humanos e uma vasta gama de outros mamíferos, incluindo cães, gatos, bovinos e animais silvestres, caracterizando seu claro potencial zoonótico. Os demais (C a H) são mais específicos de hospedeiros (FENG & XIAO, 2011). A água contaminada é o principal elo na cadeia de transmissão, unindo os ciclos doméstico, silvestre e humano (GROTT *et al.*, 2016).

O ciclo de vida de *G. lamblia* é monoxeno (um único hospedeiro) e notavelmente simples, porém eficaz. Ele se alterna entre duas formas: o trofozoíto, forma vegetativa e patogênica, e o cisto, forma de resistência e infecciosa. O cisto, eliminado nas fezes do hospedeiro, é a chave para sua sobrevivência ambiental. De formato oval, medindo entre 8-12 µm, ele é protegido por uma parede cística robusta composta por proteínas e galactosamina, que lhe confere extraordinária resistência a fatores ambientais adversos, como variações de temperatura, dessecção e, crucialmente, aos desinfetantes químicos como o cloro em concentrações usuais no tratamento de água. Um único cisto pode permanecer viável na água fria por meses (REY, 2008; TORRICO, 2014).

A infecção ocorre pela ingestão de cistos maduros, contendo quatro núcleos. No ambiente ácido do estômago, inicia-se o processo de excistação, que se completa no duodeno. Cada cisto libera dois trofozoítos. O trofozoíto é uma célula

piriforme, com simetria bilateral, medindo cerca de 15 µm, e possui oito flagelos que lhe conferem mobilidade e um disco suctor ventral, uma organela adesiva que lhe permite fixar-se firmemente à superfície dos enterócitos no intestino delgado. Ali, eles se alimentam e se multiplicam intensamente por divisão binária longitudinal. À medida que são arrastados pelo trânsito intestinal para porções mais distais, como o íleo e o cólon, o processo de encistação é desencadeado, formando novos cistos que serão eliminados nas fezes, prontos para infectar um novo hospedeiro (FENG & XIAO, 2011).

A patogenia é multifatorial e complexa, envolvendo: (i) uma barreira mecânica formada por um "tapete" de trofozoítos aderidos ao epitélio, que dificulta a absorção de nutrientes; (ii) dano direto aos enterócitos, levando à atrofia das vilosidades intestinais e hiperplasia das criptas, o que reduz drasticamente a superfície absorbtiva; (iii) indução de uma resposta inflamatória local com infiltração de linfócitos; e (iv) quebra da barreira intestinal através da indução de apoptose (morte celular programada) dos enterócitos, aumentando a permeabilidade intestinal (HALLIEZ & BURET, 2013). Clinicamente, a infecção pode ser assintomática, mas frequentemente causa diarreia, podendo ser aguda ou crônica, dor abdominal, flatulência, náuseas e esteatorreia, fezes gordurosas e malcheiroosas. Em crianças, infecções crônicas ou repetidas estão associadas à síndrome de má absorção, desnutrição, retardamento no crescimento e déficits no desenvolvimento cognitivo (SAVIOLI, SMITH & THOMPSON, 2006).

A criptosporidiose, a sua vez, é uma das principais causas de diarreia moderada a grave em crianças em países de baixa renda. A epidemiologia molecular é crucial para entender as fontes de infecção. *Cryptosporidium hominis* infecta primariamente humanos (transmissão antroponótica), enquanto *Cryptosporidium parvum* é uma zoonose clássica, tendo os ruminantes jovens como principal reservatório (THOMPSON & OLSON, 2017). Outras espécies, como *C. felis*, de gatos e *C. canis*, de cães, podem ocasionalmente infectar humanos, especialmente os imunocomprometidos.

O protozoário apresenta um ciclo monoxeno. A infecção se inicia com a ingestão de oocistos esporulados, que são a forma de resistência eliminada nas fezes. Os oocistos são esféricos, medem apenas 4-6 µm, e são ainda mais resistentes que os cistos de Giardia aos desinfetantes, incluindo o cloro, o que os tornou notórios por causar grandes surtos hídricos em cidades com sistemas de

tratamento de água considerados seguros (CDC, 2024). Após a ingestão, os oocistos liberam quatro esporozoítos infecciosos no intestino delgado. Cada esporozoíto invade um enterócito, mas se desenvolve em uma localização única: intracelular, porém extracitoplasmática, dentro de um vacúolo parasitóforo na borda em escova da célula (SAVIOLI *et al.*, 2006).

Dentro do vacúolo, o parasita passa por ciclos de reprodução assexuada, denominada merogonia, formando merontes que liberam merozoítos para infectar novas células, amplificando a infecção. Em seguida, ocorre a reprodução sexuada, denominada gametogonia, com a formação de microgametas, gametas masculinos e macrogametas, gametas femininos. A fusão destes dá origem ao zigoto, que se desenvolve em um oocisto. São formados dois tipos de oocistos: 80% são de parede espessa, que são eliminados para o ambiente com as fezes, e 20% são de parede fina, que podem se romper ainda dentro do intestino, liberando esporozoítos e causando a autoinfecção interna. Este mecanismo é responsável pela cronicidade e severidade da doença em pacientes imunocomprometidos (REY, 2008; TORRICO, 2014). A patogenia da criptosporidiose está diretamente ligada à destruição das células epiteliais intestinais, com consequente atrofia das vilosidades, má absorção e uma diarreia secretora profusa e aquosa, que pode levar a uma desidratação severa. Em indivíduos imunocompetentes, a doença é geralmente autolimitada, durando de 1 a 2 semanas. Em pacientes imunocomprometidos, como portadores de HIV/AIDS, a infecção pode se tornar crônica, debilitante e até fatal, podendo se disseminar para o trato respiratório e biliar (FEITOSA *et al.*, 2004).

2.2 A Fauna Silvestre como Reservatório e Sentinel

A investigação da saúde da fauna silvestre é uma janela para a saúde do ecossistema. Animais atropelados em rodovias, que fragmentam habitats e aproximam os ciclos silvestre e urbano, são uma fonte valiosa e oportunística de amostras para a vigilância de patógenos zoonóticos.

A ocorrência de *Trypanosoma cruzi* na fauna silvestre, tais como gambá e algumas espécies de tatu, são achados importantes para a compreensão da situação epidemiológica regional, permitindo evidenciar a existência de um ciclo enzoótico na região. O ciclo de *T. cruzi* é complexo, alternando entre um hospedeiro

invertebrado, o inseto triatomíneo, popularmente como “barbeiro” e um vertebrado, predominantemente mamíferos (CHAGAS, 1909; COURA *et al.*, 2015)

- i. O ciclo no inseto começa quando ele ingere sangue de um mamífero infectado contendo as formas tripomastigotas sanguíneas. No intestino do inseto, estas formas se transformam em epimastigotas, que se multiplicam intensamente por divisão binária. Os epimastigotas migram para o reto do inseto, onde se diferenciam nas formas infectantes, os tripomastigotas metacíclicos. Este processo leva algumas semanas.
- ii. A transmissão clássica ocorre quando o inseto infectado, ao picar, defeca próximo ao local da picada. Os tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes penetram ativamente na pele ou mucosas do hospedeiro. Uma vez na corrente sanguínea, eles invadem diversas células, especialmente as do sistema fagocítico mononuclear, fibras musculares lisas e cardíacas. Dentro da célula hospedeira, eles se transformam em amastigotas, formas arredondadas e imóveis que se multiplicam intensamente por divisão binária, formando “nínhos” que levam à destruição da célula. Ao romper a célula, os amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas sanguíneos, que caem na circulação para infectar novas células ou serem ingeridos por um novo vetor, fechando o ciclo (REY, 2008; ZINGALES *et al.*, 2012).

A doença se divide em duas fases. A fase aguda, que se segue à infecção, é frequentemente assintomática ou oligossintomática (febre, mal-estar), o que dificulta o diagnóstico. A fase crônica se desenvolve em cerca de 30-40% dos infectados, anos ou décadas depois. A patogenia crônica é complexa, envolvendo a persistência do parasita nos tecidos e uma resposta imune inflamatória crônica que leva à destruição tecidual progressiva. As principais manifestações são a cardiopatia chagásica crônica, que cursa com arritmias e insuficiência cardíaca, e as formas digestivas que cursa com megacôlon e megaesôfago. (COURA; VIÑAS, 2010).

Embora a transmissão vetorial seja a mais conhecida, outras vias são epidemiologicamente relevantes hoje, especialmente a transmissão oral, pela ingestão de alimentos contaminados (como açaí ou caldo de cana) com fezes de triatomíneos ou com carne de caça crua. Esta via costuma causar surtos agudos e graves (COURA, 2015). Espécies como o gambá (*Didelphis spp.*) e o tatu (*Dasypus spp.*) são reservatórios primários e de grande importância. O gambá, em particular, é um reservatório sinantrópico por excelência: ele se adapta ao ambiente

peridomiciliar, invade forros de casas e galinheiros, e pode albergar tanto o *T. cruzi* quanto os triatomíneos em seus ninhos, funcionando como uma "ponte" que liga o ciclo silvestre ao doméstico (JANSEN *et al.*, 2018). A presença do parasita nestes animais na região de Pelotas é um indicador inequívoco de risco.

Outro tripanosomatídeo importante para a saúde única é a *Leishmania* spp., responsável pela leishmanioses cutânea e visceral. Seu ciclo de vida é digenético, caracterizado pela alternância entre o hospedeiro vertebrado, que abriga a forma amastigota do parasita, e o vetor invertebrado, o flebotomíneo – popularmente conhecido como “mosquito-palha” (LEONEL *et al.*, 2024). No vetor, a infecção se inicia com a ingestão das amastigotas presentes no sangue do hospedeiro infectado. No intestino médio do flebotomíneo, esses amastigotas sofrem diferenciação em promastigotas, as quais se multiplicam ativamente e migram para a porção anterior do intestino, onde se transformam em promastigotas metacíclicas, a forma infectante (LEONEL *et al.*, 2024). Esse processo, que dura em torno de 7 a 14 dias, é crucial para a transmissão, pois quando o mosquito-palha pica um novo hospedeiro, ele regurgita os promastigotas metacíclicas, que ao serem fagocitados pelos macrófagos, transformam-se novamente em amastigotas, iniciando a disseminação sistêmica do parasita (LEONEL *et al.*, 2024; READY & ROGERS, 2013). A Leishmaniose visceral, ou calazar, caracteriza-se por sinais clínicos graves, como febre prolongada, emagrecimento, esplenomegalia e hepatomegalia, além de causar imunossupressão, enquanto a Leishmaniose Cutânea se apresenta com lesões cutâneas e mucosas de diferentes dimensões e distribuições (KNIGHT *et al.*, 2023). A diversidade de manifestações clínicas e a variação na resposta imune do hospedeiro demonstram a complexidade da patogenia e reforçam a importância do estudo detalhado de cada ciclo de transmissão.

Adicionalmente, a identificação de *Leishmania* spp. em reservatórios silvestres ressalta que esses animais podem atuar como fontes de infecção para os vetores, contribuindo para a manutenção do ciclo natural do parasita (LAINSON, 1988; RAPELLO *et al.*, 2024). Essa dinâmica é particularmente relevante em áreas de ecótono, onde a proximidade entre os ambientes naturais e as áreas urbanas favorece a transmissão para humanos, especialmente em contextos de expansão urbana e degradação ambiental (RAPELLO *et al.*, 2024). Dessa forma, o monitoramento tanto da fauna silvestre quanto dos vetores, aliado a estratégias integradas de controle, é fundamental para a gestão e prevenção da leishmaniose.

3 Objetivo Geral:

Avaliar a ocorrência de protozoários zoonóticos em animais silvestres atropelados e em amostras de águas brutas na região sul do Rio Grande do Sul.

3.1 Objetivos Específicos:

- i) Detectar, através de técnicas de biologia molecular, o DNA de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Giardia lamblia*, *Cystoisospora* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras de tecidos de animais silvestres atropelados em rodovias da região.
- ii) Detectar, através de técnicas de biologia molecular, o DNA de *Giardia lamblia*, *Cystoisospora* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras de águas brutas da cidade de Pelotas e municípios limítrofes.

4 Materiais e Métodos

O presente estudo foi conduzido na região Sul do Estado do Rio Grande do Sul (RS), abrangendo a microrregião de Pelotas e municípios adjacentes, incluindo Pelotas, Capão do Leão, Pedro Osório, Canguçu, Morro Redondo, Rio Grande, Bagé e Santa Vitória do Palmar. A região possui um clima subtropical úmido, historicamente associado a condições climáticas que, no passado, não favoreciam a manutenção de vetores, como os transmissores de *Leishmania* spp. (HIRSCHMANN *et al.*, 2017). No entanto, o cenário epidemiológico tem mudado, com o aumento da disseminação de *Leishmania* spp. e o risco de expansão de seu ciclo silvestre (PRADELLA *et al.*, 2020; KONO *et al.*, 2023).

Todos os pontos de atropelamento do estudo foram mapeados de acordo com o descrito por Caldart *et al.* (2021), por meio do sistema de posicionamento global (GPS) com o aplicativo móvel MyGPS Coordinates a fim de gerar um mapa de maior incidência de animais atropelados e mortos de acordo com o proposto inicialmente neste projeto.

Todos os procedimentos e coletas foram realizados em estrita conformidade com as normas éticas e legais vigentes. O estudo possui as devidas autorizações do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA nº 182/2024/CEUA - Processo nº 23110.038090/2024-45), do Sistema de Autorização e Informação sobre a Biodiversidade (SISBIO nº 96569-1), e para o acesso e gestão do patrimônio genético pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN nº A804F27).

4.1 Coleta e Processamento de Amostras de Animais Silvestres:

Entre fevereiro e agosto de 2025, foram realizadas coletas mensais de carcaças de animais silvestres vítimas de atropelamento, concentrando-se em um importante corredor ecológico facilitando a movimentação de espécies entre fragmentos de habitat, mas também apresentam riscos, como atropelamentos e fragmentação de habitats (DIAS *et al.*, 2021; GOMES *et al.*, 2019). O monitoramento abrangeu, conforme demonstrado na Figura 1, os trechos rodoviários a seguir: BR-293 (do Km 0 ao Km 153); a BR-116 (do Km 526 ao Km 752); a BR-392, desde o seu entroncamento com a BR-116 no Km 67,8 até o Km 111; a BR-471, do seu

entroncamento com a BR-116 no Km 526 até o Km 530; e, adicionalmente, toda a extensão da Avenida Eliseu Maciel no município de Capão do Leão, via que atualmente integra o traçado da BR-392. O critério de inclusão para as amostras foi o bom estado de conservação da carcaça, visando minimizar a degradação tecidual e a ocorrência de contaminações ou infestações parasitárias *post-mortem*. No local da coleta, cada espécime foi acondicionado em um saco plástico individual e devidamente identificado com etiqueta contendo a data e as coordenadas geográficas precisas. Posteriormente, as carcaças foram transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Veterinária da UFPel para a realização das necrópsias e, quando possível, coleta de sangue em tubos EDTA. Durante este procedimento, foram coletados fragmentos de órgãos-alvo (fígado, coração, baço, intestinos, tecido muscular, entre outros). As amostras de tecido foram imediatamente acondicionadas e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C para preservar a integridade do material genético até as análises posteriores.

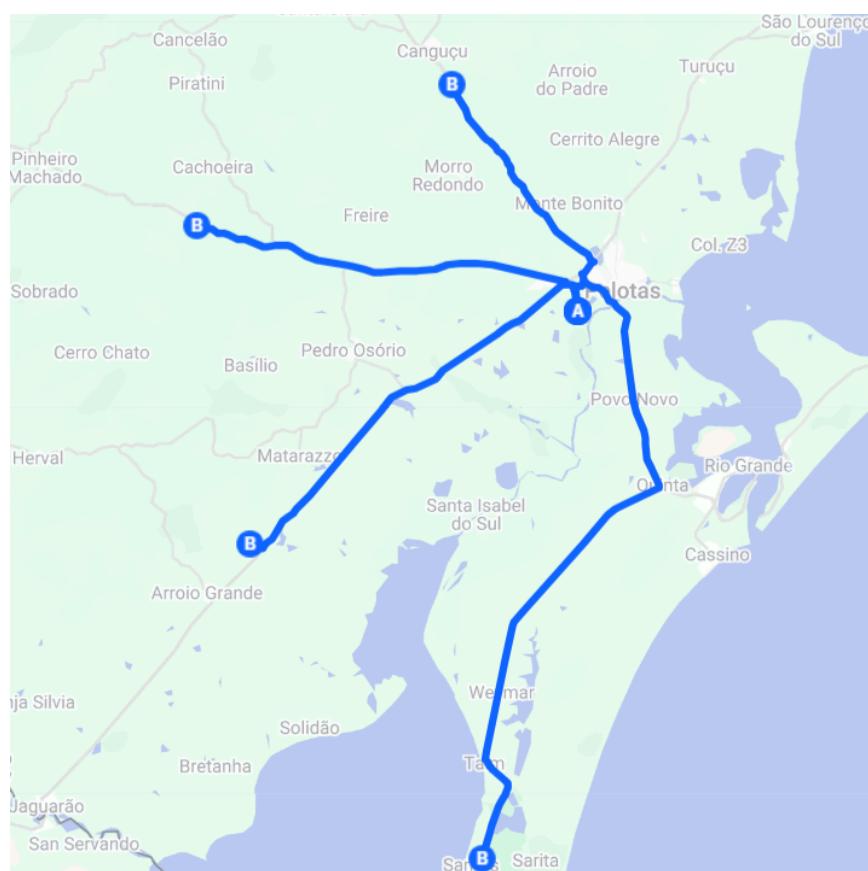


Figura 1: Distribuição espacial e trechos rodoviários monitorados para coleta de fauna atropelada (Fevereiro–Agosto, 2025). O mapa ilustra o corredor rodoviário investigado no Sul do Rio Grande do Sul, delimitado pelas quilometragens das vias BR-293 (Km 0–153), BR-116 (Km 526–752), BR-392 (Km 67,8–111) e BR-471 (Km 526–530), além da Avenida Eliseu Maciel (BR-392) em Capão do Leão.

4.2 Coleta e Processamento de Amostras de Água:

A amostragem de água bruta foi realizada em oito pontos estratégicos na região de estudo, cujas localizações estão referenciadas na Figura 2. Os pontos de coleta englobam cursos d'água cruciais para a dinâmica hídrica regional, incluindo o Arroio Moreira e o Arroio Pelotas (este último formado pela junção dos Arroios das Caneleiras e do Quilombo, que atravessam as áreas rurais de Pelotas). O Canal São Gonçalo — que serve como principal via fluvial de escoamento para toda a bacia hidrográfica da região, conectando a Lagoa Mirim e a Lagoa dos Patos — também foi monitorado. Adicionalmente, foram incluídos os Canais Santa Bárbara, Pepino e São Francisco, que compõem a área de escoação de águas brutas da cidade. Em todos os casos, essas águas confluem para a Lagoa dos Patos, onde se localiza o último ponto de coleta na Praia do Laranjal. As coordenadas geográficas dos pontos amostrados são: Arroio Moreira ($31^{\circ} 45' 38.6''$ S, $52^{\circ} 24' 09.2''$ O); Barragem Santa Bárbara ($31^{\circ} 42' 47.8''$ S, $52^{\circ} 22' 23.6''$ O); Canal Santa Bárbara ($31^{\circ} 46' 13.5''$ S, $52^{\circ} 21' 32.8''$ O); Canal do Pepino ($31^{\circ} 46' 41.4''$ S, $52^{\circ} 19' 38.5''$ O); Arroio Pelotas ($31^{\circ} 46' 21.1''$ S, $52^{\circ} 16' 54.7''$ O); Canal São Gonçalo ($31^{\circ} 46' 24.2''$ S, $52^{\circ} 17' 10.5''$ O); Canal São Francisco ($31^{\circ} 45' 48.1''$ S, $52^{\circ} 18' 54.9''$ O); e Praia do Laranjal ($31^{\circ} 46' 05.6''$ S, $52^{\circ} 13' 35.0''$ O).

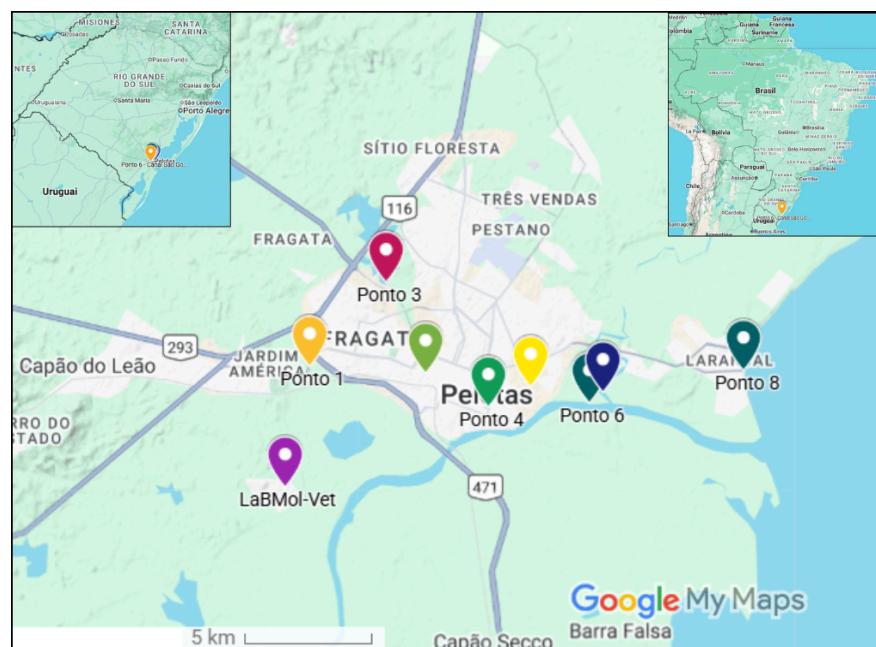


Figura 2: Mapa dos oito pontos de coleta de água bruta utilizados para a pesquisa na região de Pelotas, Sul do Rio Grande do Sul. Os pontos monitorados incluem arroios e canais de escoamento que desaguam na Lagoa dos Patos.

As coletas seguiram as diretrizes do protocolo da FUNASA (BRASIL, 2020), com um intervalo de seis semanas entre cada coleta, durante o período de março a agosto de 2025. Em cada ponto, foram registrados os parâmetros físico-químicos *in situ*, incluindo pH, temperatura da água e temperatura do ambiente, além da data e do horário. Adicionalmente, o volume pluviométrico no intervalo entre as coletas foi sistematicamente monitorado. Adotou-se o critério rigoroso de não realizar coletas durante ou nas 48 horas subsequentes a eventos de chuva. Para evitar a influência de alterações nas amostras de água bruta devido ao escoamento superficial (*runoff*) — que, em decorrência de eventos de chuva, arrasta excesso de sólidos, turbidez e contaminantes microbiológicos e químicos aos cursos d'água —, adotou-se o critério de não realizar coletas durante ou nas 48 horas posteriores a eventos meteorológicos de chuva.

O escoamento superficial, especialmente após chuvas, carrega sedimentos e poluentes que podem distorcer significativamente a qualidade da água analisada. Por exemplo, um estudo de Bertol *et al.* (2007) evidencia que o escoamento superficial pode aumentar a carga de nutrientes e poluentes na água, influenciando os resultados das análises de qualidade da água. Isso mostra que a contaminação pode ser agravada em dias chuvosos, tornando as coletas realizadas nesses períodos pouco confiáveis para a avaliação das condições basais do corpo d'água. Este procedimento metodológico é fundamental para garantir a representatividade da amostra em relação às condições basais do corpo d'água, aumentando a comparabilidade dos dados e reduzindo potenciais interferências analíticas.

4.3 Análise Molecular

4.3.1 Amostras de Sangue

A extração de DNA das amostras de sangue total foi realizada com o reagente TRIzol®. Para cada amostra, 300 µL foram transferidos para um microtubo de 2 mL (Kavsi, Brasil), aos quais foram adicionados 1 mL de TRIzol® (Invitrogen™, EUA). A mistura foi homogeneizada em vórtex (VX-18, IonLab, Brasil) e mantida em temperatura ambiente por 10-15 minutos, para permitir a desnaturação completa de nucleoproteínas.

Em seguida, realizou-se a purificação com solventes orgânicos. Adicionaram-se 200 µL de clorofórmio (Labsynth, Brasil), seguido de

homogeneização e mantida por 2-3 minutos em temperatura ambiente. A separação das fases foi obtida por centrifugação a 13.000 RPM por 10 minutos a 4 °C em centrífuga refrigerada (NT 805, Novatecnica, Brasil).

O sobrenadante aquoso foi transferido para um novo microtubo, e o DNA foi precipitado pela adição de 1 mL de etanol absoluto gelado. Após homogeneização por inversão, as amostras foram incubadas a -20 °C por uma hora e centrifugadas a 13.000 RPM por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* de DNA foi lavado com 1 mL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 13.000 RPM por 2 minutos. Após a remoção do sobrenadante e a secagem completa do *pellet* em temperatura ambiente, o DNA foi ressuspensos em 100 µL de água livre de DNase e incubado a 37 °C por uma hora.

4.3.2 Amostras de Tecido

Para a extração de DNA de fragmentos de tecidos (fígado, coração, baço, intestinos e pulmões), utilizou-se o reagente Quick-Zol (Ludwig Biotecnologia, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, aproximadamente 100 mg de cada tecido foram homogeneizados em 1 mL de Quick-Zol. Após um período de 5 minutos à temperatura ambiente para garantir a dissociação de complexos proteicos, adicionaram-se 200 µL de clorofórmio. A mistura foi vigorosamente agitada e centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C para separação de fases.

A fase aquosa superior foi descartada, e o DNA foi precipitado da fase intermediária/orgânica pela adição de 300 µL de etanol 100%. Após centrifugação a 2.000 x g por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi removido. O *pellet* de DNA foi submetido a duas lavagens: a primeira com 2 mL de etanol 75% e incubação de 30 minutos, e a segunda com etanol 100%. A cada lavagem, o DNA foi recuperado por centrifugação a 2.000 x g por 5 minutos. Finalmente, o *pellet* seco foi ressuspensos em água ultrapura e estocado a -20 °C.

4.3.3 Processamento de Amostras de Água Bruta e Extração de DNA

O processamento das amostras de água foi realizado em duas etapas:

- i) Filtração e Análise Microbiológica: As amostras de água bruta foram inicialmente filtradas para concentrar a biomassa em suspensão, seguindo uma metodologia adaptada de GROTT *et al.* (2016), utilizando um volume total de dois litros de água bruta para a pesquisa de protozoários suspensos em água. Em seguida, uma alíquota de 100 µL de cada amostra homogeneizada foi semeada em placas de ágar MacConkey, que foram incubadas a 37 °C por 24-48 horas.
- ii) Extração de DNA de Colônias Bacterianas: Para a confirmação molecular, colônias selecionadas foram suspensas em solução salina fosfatada (PBS). A extração do DNA bacteriano foi então realizada com o reagente TRIzol® descrito no item 5.3.1.1.

4.3.4 Quantificação e Análise de Pureza do DNA

Após a extração, a concentração e a pureza de todo o DNA obtido foram aferidas em espectrofotômetro (NanoDrop Lite, Thermo Fisher Scientific, EUA). Para cada amostra, de 1 µL foram aplicados no pedestal de leitura do equipamento. A pureza foi avaliada pela razão de absorbância A260/A280, sendo consideradas adequadas para as análises posteriores as amostras com valores entre 1,5 e 2,1 ($1,8 \pm 0,3$), conforme recomendação do fabricante.

4.3.5 Análise Molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Detecção de *Cryptosporidium spp.*

Para a pesquisa de *Cryptosporidium spp.*, com base no protocolo de Xiao *et al.* (1999), a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1300 pares de base (pb) do gene SSU rRNA foi realizada com os primers SSU-F2 (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3') e SSU-R2 (3'-CCCATTCCTCGAACAGGA-5'). As reações tinham um volume final de 25 µL, contendo 2 µL de DNA com concentração de ~100 ng/µL, 1,0 µL de cada primer de 0,1 µM, 2,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 2,5 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, pH 8.5 e 500 mM KCl), 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,25 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e 14 µL de água ultrapura. As condições de amplificação consistiam em: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 45 segundos,

anelamento 56 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto; e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Detecção de *Cystoisospora spp.*

A detecção de *Cystoisospora spp.*, com base no protocolo de Samarasinghe *et. al.* (2008), foi realizada por meio de uma Nested PCR direcionada à região ITS1 do rDNA.

- i) Primeira Reação (PCR): A reação inicial, em um volume de 25 µL, utilizou os primers ITS-F (5'-CCGTTGCTCCTACCGATTGAGTG-3') e EMR7 (5'-GCATTCGCTGCGTCCTTCATCG-3'). A mistura de reação continha 12,5 pmol de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 0,5 U de Taq-Polimerase e 2 µL de DNA com concentração de ~100 ng/µL. As condições de ciclagem são: uma etapa inicial de 94 °C por 2 min; seguida por 45 ciclos de 94 °C por 30 segundos, anelamento a 62 °C por 20 segundos e extensão a 72 °C por 35 segundos; e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.
- ii) Segunda Reação (Nested PCR): Utilizando o produto da primeira reação como molde, uma segunda amplificação foi feita com os primers internos ITSG-F (5'-GATCATTACACACGTGGCCCTT-3') e ITS-R2 (5'-GACGACGTCCAAATCCACAGAGC-3') para gerar um fragmento de aproximadamente 450 pb. As condições de reação e ciclagem foram as mesmas da primeira PCR, com exceção da temperatura de anelamento, que foi elevada para 68 °C.

Detecção de *Escherichia coli* produtora de Shiga toxina (STEC)

Para a identificação de STEC, foi realizado um ensaio de multiplex PCR (mPCR) para a detecção simultânea dos genes da Shiga toxina 1 (*stx1*), Shiga toxina 2 (*stx2*) e, como controle interno, do gene 16S rRNA de *E. coli*, com base no protocolo de Osek *et. al.* (2003). A reação foi ajustada para um volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de DNA molde com concentração de ~100 ng/µL, tampão 1x (*Taq Buffer* contendo 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 50 mM KCl e 0.08% Nonidet P40), 200 µM de cada dNTP, 5 mM de MgCl₂ e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Foram utilizados os primers LP30/LP31 para o gene *stx1* e LP43/LP44 para o gene *stx2*, ambos na concentração final de 0,1 µM, e os primers 16S-F/16S-R para o gene 16S

rRNA na concentração de 0,05 μ M. O volume foi completado com água ultrapura. As condições de ciclagem consistiam em desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, anelamento a 53 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; e uma etapa final a 53 °C por 7 minutos. Os amplicons esperados eram de 348 pb (*stx1*), 584 pb (*stx2*) e 798 pb (16S rRNA).

Detecção de *Giardia lamblia*

Para a detecção de *G. lamblia*, com base no protocolo de Hopkins *et al.* (1997), foi amplificado um fragmento de 292 pb da extremidade 5' do gene SSU-rRNA. Foram utilizados os primers RH11 (5'-CATCCGGTCGATCCTGCC-3') e RH4 (5'-AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG-3'). A reação foi realizada em um volume de 25 μ L, contendo 12,5 pmol de cada primer, 200 μ M de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1 unidade de Taq-Polimerase e 2 μ L de DNA com concentração de ~100 ng/ μ L. As condições de amplificação consistiram em uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 59 °C por 20 segundos e 72 °C por 30 segundos; seguidos de uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Detecção de *Leishmania spp.*

Para a pesquisa de *Leishmania spp.*, com base no protocolo de El Tao *et al.* (2000), foi amplificada a região ITS1 do operon ribossomal, gerando um produto de aproximadamente 320 pb. A reação foi realizada com os primers LITSR (5'-CTGGATCATTTCGATG-3') e L5-8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'). Em um volume final de 25 μ L, a mistura de reação continha 1 μ L de DNA com concentração de ~100 ng/ μ L, 25 pmol de cada primer, 200 μ M de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 2 U de Taq polimerase. As condições de ciclagem consistiram em uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos; seguida por 35 ciclos de 94 °C por 20 segundos, anelamento a 53 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto; com uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Detecção de *Trypanosoma cruzi*

A detecção de *T. cruzi*, com base no protocolo de Schijman *et al.* (2011), foi direcionada ao DNA do cinetoplasto (kDNA) para amplificar um fragmento de 330 pb. Foram empregados os primers 121 (5'-AAATAATGTACGGGAGATGCATGA-3') e 122 (5'-GGTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'). A reação foi conduzida em um

volume de 25 µL, 10 µM de cada primer, 200 µM de dNTPs, 3 mM de MgCl₂ e 1,5 U de Taq-Polimerase, 2 µL de DNA com concentração de ~100 ng/µL. O protocolo de ciclagem seguiu uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C por 2 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, anelamento a 62 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto; e uma extensão final de 7 minutos a 72 °C.

4.3.6 Processamento de Amostras por PCR e Análise por Eletroforese

O processamento das amostras por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizado utilizando diferentes equipamentos termocicladores: Termociclador convencional Bio-Rad® T100, Eppendorf® Mastercycler gradient e Applied Biosystems® 2720. Para o controle de qualidade das reações, foi utilizada água ultrapura (H₂O DNase Free) como controle negativo. Como controles positivos, foram empregadas amostras de DNA previamente confirmadas, disponíveis no LaBMol-Vet (Laboratório de Biologia Molecular Veterinária), além de controles de *Cryptosporidium* spp. cedidos pelo Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal de Santa Maria, e controles de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. fornecidos pelo Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Tabela 1: Parâmetros moleculares e de eletroforese utilizados na detecção de protozoários e bactérias zoonóticas em amostras de água e fauna.

Patógeno	Sequência-Alvo	Fragmento (bp)	Primers	Protocolo	Concentração do Gel
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Gene SSU rRNA	1318 bp	Cryptosporidium_SSU-F2 e Cryptosporidium_SSU-R2	XIAO <i>et al.</i> (2000)	1,2%
<i>Leishmania</i> spp.	Região ITS1	320 bp	LISTR e L5.8s	EL TAI <i>et al.</i> (2000)	1,5%
<i>Trypanosoma cruzi</i>	DNA do Cinetoplasto (kDNA)	330 bp	121 and 122	SCHIJMAN <i>et al.</i> (2011)	1,5%
<i>Cystoisospora</i> spp.	18s rRNA e ITS1 rDNA	450 bp	ITSF e EMR7 / ITSGF e ITSR2	SAMARASIN GHE <i>et al.</i> (2008)	1,5%
<i>Giardia lamblia</i>	18S rRNA	292 bp	RH11 e RH4	HOPKINS <i>et al.</i> (1997)	1,5%
<i>Escherichia coli</i>	16s rRNA	798 bp	16S-R e 16S-R	OSEK <i>et al.</i> (2003)	1,5%

Para a análise dos resultados das reações de PCR, conforme protocolos apresentados na Tabela 1, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese. Inicialmente, as alíquotas de 12 µL de cada produto foram homogeneizadas com 2 µL de tampão de carregamento (Azul de Bromofenol com Glicerol) e aplicadas nos poços do gel. O gel de agarose foi preparado em tampão TBE (1x) e revelado com brometo de etídio (incorporado ao gel e ao tampão em uma concentração final de aproximadamente 0,5 µg/mL), seguindo a metodologia descrita por Osek *et al.* (2003). A concentração padrão do gel foi de 1,5% de agarose. Contudo, essa concentração foi ajustada para 1,2% com o objetivo de otimizar a resolução de fragmentos de tamanho superior a 1000 pb (pares de base), prática comum em protocolos de detecção molecular (Hopkins *et al.*, 1997; Samarasinghe *et al.*, 2008; Schijman *et al.*, 2011).

A corrida eletroforética foi conduzida a 110 V por um período de 45 a 60 minutos para garantir a separação adequada das bandas. Em cada gel, foi aplicado um marcador de peso molecular (50 pb Ladder), que serviu como referência para a estimativa do tamanho dos amplicons (Osek *et al.*, 2003). Após a corrida, os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz ultravioleta em um transiluminador (Hoefer Scientific MacroVue UV-25, EUA) e o registro fotográfico dos géis foi realizado por um sistema de documentação digital. As amostras foram consideradas positivas pela visualização de bandas nítidas e com o peso molecular esperado para cada par de primers, conforme comparado com o marcador de peso molecular (Hopkins *et al.*, 1997; Osek *et al.*, 2003).

4.4 Análise Estatística

A análise dos dados obtidos foi conduzida por meio de estatística descritiva, com foco no cálculo da frequência absoluta e relativa de amostras positivas. Este procedimento visou quantificar a ocorrência dos protozoários (*Cryptosporidium* spp., *Cystoisospora* spp., *Giardia lamblia*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp.) e demais patógenos entéricos identificados nos animais silvestres e nas águas brutas da região. Todas as análises e manipulações dos dados foram realizadas com o auxílio das ferramentas estatísticas e planilhas eletrônicas disponíveis no Google Sheets.

5 Resultados e Discussão

Os dados obtidos revelam um cenário complexo, dinâmico e interconectado de circulação de patógenos zoonóticos na região Sul do Rio Grande do Sul, corroborando a pertinência da abordagem de Saúde Única como estratégia para compreensão e mitigação dos riscos. A investigação integrada da fauna silvestre atropelada nas rodovias da região e dos recursos hídricos que atravessam a região e deságuam na Lagoa dos Patos, demonstrou a presença e a sobreposição espacial e temporal de diversos protozoários de relevância epidemiológica. Essa sobreposição sugere um papel ativo do ambiente como elo de transmissão entre os diferentes hospedeiros.

5.1 Protozoários detectados em Animais Silvestres

A análise molecular de amostras provenientes de 25 animais silvestres (Figura 3) revelou uma alta prevalência de protozoários patogênicos. O agente mais frequente foi o *Trypanosoma cruzi*, detectado em 20 indivíduos (prevalência absoluta) de um total de 25, o que representa uma prevalência relativa de 80%. Essa detecção abrangeu uma ampla diversidade de espécies hospedeiras, apresentadas em detalhe na Tabela 1, incluindo diversos mamíferos (gambá-de-orelha-branca, tatu-galinha, graxaim-do-mato, zorrilho, rato-do-banhado, capivara, veado-campeiro, quati) e aves (saracura-do-mato, tachã-cinzenta e falcão-peregrino), entre outras espécies apresentadas nos materiais suplementares deste trabalho.

Essa amplitude evidencia um ciclo enzoótico robusto e consolidado na região, com notável potencial de transbordamento zoonótico para animais domésticos e humanos. A inclusão desses múltiplos hospedeiros corrobora a complexidade evolutiva e ecológica da Doença de Chagas, conforme ilustrado por Prata *et al.* (2011), que descrevem o desenvolvimento da doença a partir do ciclo silvestre. Adicionalmente, o achado reforça a importância de investigações voltadas para a ocorrência de tripanosomatídeos em vetores e hospedeiros alternativos, como o trabalho de Peixôto *et al.* (2022) em carapatos associados a capivaras, sublinhando a natureza multivetorial e multirreservatório da transmissão na região.

Outros protozoários também foram detectados, embora com menor frequência, como *Leishmania* spp. (n = 4) e *Trypanosoma* spp. (n = 1) diferente de *Trypanosoma cruzi*, evidenciando a diversidade de patógenos em circulação.

Protozoários de transmissão fecal-oral também estiveram presentes nas amostras de tecidos intestinais, com destaque para *Giardia lamblia* em seis animais e *Cystoisospora* spp. em cinco.

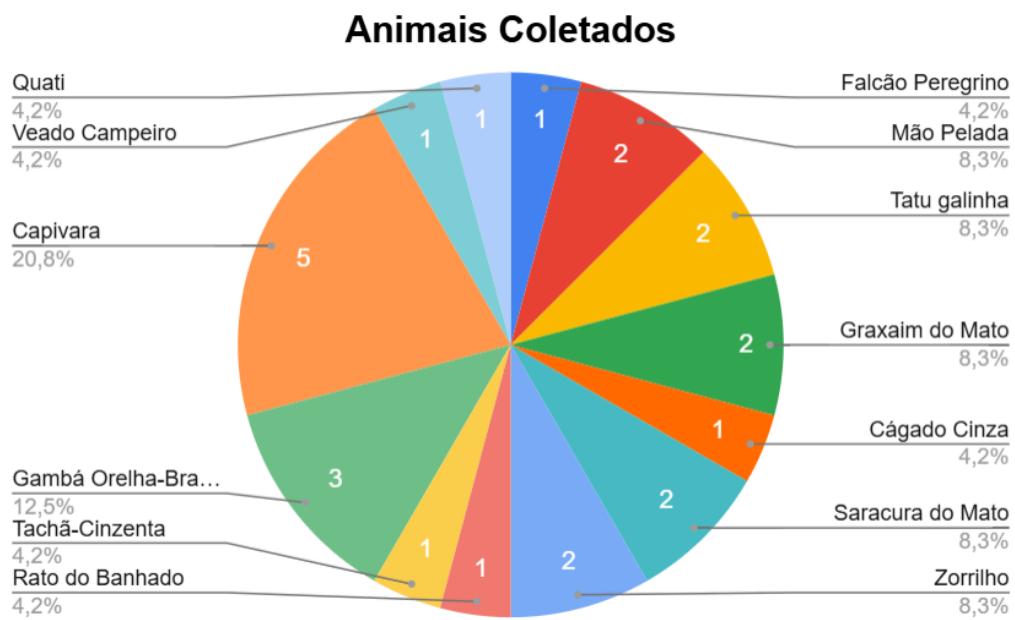


Figura 3: Distribuição da fauna silvestre coletada (n=25) em incidentes de atropelamento nas rodovias na Região Sul do RS. O gráfico ilustra a frequência absoluta das espécies que compõem o plantel monitorado.

A ausência de *Cryptosporidium* spp. na amostragem da fauna silvestre é um achado relevante, mas sua interpretação deve ser feita com cautela. Esse resultado pode indicar que o ciclo silvestre não exerce um papel central na disseminação ambiental do patógeno, sugerindo que fontes antroponóticas, como o esgoto urbano, tradicionalmente associado a *C. hominis*, ou animais de produção, especialmente bovinos portadores de *C. parvum*, sejam as principais vias de contaminação dos corpos d'água (PUMIPUNTU & PIRATAE, 2018). Entretanto, é importante reconhecer que a não detecção pode refletir desafios metodológicos inerentes à identificação de *Cryptosporidium* spp. Já demonstrou-se que a excreção de oocistos ocorre de forma intermitente, o que pode levar a falsos negativos quando amostragens pontuais são realizadas, mesmo em animais infectados (ROBERT-GANGNEUX *et al.*, 2025). Além disso, o perfil dos indivíduos amostrados, predominantemente adultos, como os obtidos em casos de atropelamento, pode influenciar os resultados, pois filhotes ou animais em extremos etários tendem a

apresentar padrões de excreção e cargas parasitárias mais elevados (MARTÍ-MARCO *et al.*, 2023). Esses aspectos destacam a necessidade de adotar abordagens metodológicas mais abrangentes, que permitam diferenciar entre a verdadeira ausência de infecção e limitações técnicas dos protocolos de coleta e detecção. Assim, recomenda-se a realização de estudos complementares com análises segmentadas por faixa etária e o emprego de técnicas analíticas alternativas, que aumentem a sensibilidade e a confiabilidade na identificação de *Cryptosporidium* spp. (ROBERT-GANGNEUX *et al.*, 2025; CUNHA *et al.*, 2019).

Tabela 2: Ocorrência e Prevalência de Protozoários Zoonóticos em Animais Silvestres Coletados no Sul do Rio Grande do Sul (Fevereiro–Agosto, 2025). Detalha-se o número absoluto (n) e a prevalência relativa (%) de protozoários zoonóticos detectados em 25 animais silvestres, assim como, a listagem das espécies hospedeiras parasitadas por cada agente.

Patógeno	Casos Positivos (n)	Prevalência (%)	Espécies Parasitadas
<i>Trypanosoma cruzi</i>	20	80	Gambá de Orelha Branca, Falcão Peregrino, Tatu-Galinha, Graxaim do Mato, Saracura do Mato, Zorrilho, Rato do Banhado, Tachã-Cinzenta, Capivara, Veadão Campeiro, Quati
<i>Leishmania</i> spp.	4	16	Gambá de Orelha Branca, Capivara, Graxaim do Mato, Quati
<i>Trypanosoma</i> spp. (não-cruzi)	1	4	Mão Pelada
<i>Giardia lamblia</i>	6	24	Graxaim do Mato, Tatu-Galinha, Saracura do Mato, Zorrilho, Capivara
<i>Cystoisospora</i> spp.	5	20	Gambá de Orelha Branca, Cágado Cinza, Tatu-Galinha, Zorrilho
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	0	N/A

A detecção de *Leishmania* spp. em quatro indivíduos da fauna silvestre, provenientes de duas áreas geograficamente distintas e tradicionalmente consideradas de baixa prevalência no Rio Grande do Sul, é um achado que sugere uma dinâmica epidemiológica mais complexa do que a suposta para a região. Este resultado evidencia a circulação do parasito mesmo em zonas com baixa incidência clínica, o que pode ser reflexo da presença de vetores competentes e das alterações no uso da terra que intensificam o contato na interface nativa-antropogênica (Pradella *et al.*, 2020; Osmari *et al.*, 2024).

Especificamente, a identificação de *Leishmania* spp. em espécies como o graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*) e o quati (*Nasua nasua*), configura um achado epidemiológico importante, confirmando a existência de um ciclo enzoótico ativo que envolve a fauna local (LAINSON, 1988). Isso reforça o entendimento de que os reservatórios silvestres mantêm e disseminam o parasito independentemente do ciclo urbano, sendo um fator de complexidade na dinâmica da leishmaniose em regiões de ecótono (LAINSON, 1988; RAPELLO *et al.*, 2024).

A relevância deste resultado reside na capacidade da fauna silvestre de atuar como reservatório ou marcador da presença do agente etiológico em áreas consideradas de baixo risco. Os dados obtidos contribuem para a compreensão de que, no Rio Grande do Sul, fatores ambientais e ecológicos propícios à presença de vetores podem sustentar a transmissão, mesmo que de forma discreta, ajudando a desvendar um ciclo que pode estar subdiagnosticado na região (Osmari *et al.*, 2024).

Essa situação reforça a importância do monitoramento contínuo não apenas dos hospedeiros domésticos, mas também dos da fauna silvestre, sobretudo em áreas que historicamente não eram vistas como focos de leishmaniose, evidenciando uma complexa interface entre ecologia, alterações ambientais e dinâmica de vetores (Pradella *et al.*, 2020; , Osmari *et al.*, 2024). Na Estação Ecológica Taim, localizada em uma região úmida costeira com predomínio de ecossistemas alagadiços e baixa densidade populacional humana, o registro positivo em uma Capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) representa um achado epidemiologicamente significativo. Essa espécie, pela sua abundância local, hábito gregário e mobilidade em ambientes aquáticos e terrestres, pode atuar como hospedeiro de manutenção ou amplificação, facilitando a circulação do parasita em nichos não tradicionalmente monitorados (SILVA *et al.*, 2009; AZAMI-CONEZA *et al.*, 2021).

A variabilidade climática associada aos fenômenos *El Niño* e *La Niña* tem sido amplamente documentada na literatura e está relacionada com alterações no regime pluviométrico, conforme demonstrado por Matzenauer *et al.* (2018). No sul do Brasil, a presença de anomalias pluviométricas, com elevados índices de chuva durante eventos *El Niño* e reduções associadas à *La Niña*, é identificada, especialmente durante os meses críticos da primavera, especialmente outubro e novembro (MATZENAUER *et al.*, 2018). Essa alternância na disponibilidade hídrica pode

modificar expressivamente o microambiente em que os vetores flebotomíneos se desenvolvem.

Além disso, os impactos do *El Niño* e da *La Niña* sobre os padrões de precipitação, associados a flutuações térmicas e à ocorrência de ondas de calor, podem alterar tanto a quantidade quanto a distribuição temporal dos eventos pluviométricos, como discutido por Minuzzi e Frederico (2017). Mudanças resultantes, que incluem períodos prolongados de atividade pluviométrica intercalados com secas severas, podem favorecer transformações na dinâmica dos vetores. Se sugere que ambientes submetidos a extremos de umidade e temperatura podem ampliar o período de atividade dos insetos e aumentar sua capacidade de dispersão, devido à adaptação a condições ambientais alteradas (MEDEIROS *et al.*, 2021).

Episódios recorrentes de seca têm o potencial de reduzir a disponibilidade de habitats tradicionais, incentivando a colonização de novas áreas e aumentando o contato entre os vetores e os hospedeiros humanos ou animais. Embora pensadores tenham evidenciado que vetores flebotomíneos sejam escassos, a consistência dos resultados na modulação dos padrões climáticos reforça a hipótese de que tais alterações possam contribuir para a dispersão e a extensão do período ativo desses organismos (MATZENAUER *et al.*, 2018).

Portanto, a intermitência entre períodos de intensa pluviosidade (associada ao *El Niño*) e fases secas (imputáveis à *La Niña*), juntamente com episódios históricos de seca, cria um cenário climático dinâmico que pode levar a alterações no comportamento e na distribuição dos vetores flebotomíneos. Essa hipótese se fundamenta não somente na variação quantitativa da precipitação, mas também nas mudanças estruturais do ambiente que elas promovem, afetando diretamente os fatores que regulam a atividade, a sobrevivência e o potencial de dispersão dos insetos. Além disso, o aumento de temperaturas médias e a modificação de micro-habitats pela atividade antrópica podem ter criado condições propícias para o estabelecimento de populações vetoriais em áreas antes consideradas marginais para a transmissão (BARTÁ *et al.*, 2021; CORDEIRO, 2016). A conjunção desses fatores sugere que os casos detectados podem representar não apenas eventos esporádicos, mas sinais iniciais de uma expansão geográfica do ciclo silvestre de *Leishmania* spp. no sul do estado, demandando vigilância ativa e estudos entomológicos complementares.

5.1.1 Co-infecções na fauna silvestre

A ocorrência de coinfecções em fauna silvestre é um indicativo preocupante de que os animais estão submetidos a uma intensa pressão de exposição a múltiplos agentes patogênicos, o que pode agravar os impactos tanto na saúde dos hospedeiros quanto na dinâmica dos ecossistemas. Em ambientes onde há sobreposição de habitats, especialmente em áreas de interface entre ecossistemas naturais e zonas de influência antropogênica, a convergência de diferentes fontes de patógenos aumenta a probabilidade de infecções múltiplas. Evidenciou-se que, em cenários de alta densidade e diversidade de agentes infecciosos, os animais frequentemente são expostos a um espectro de patógenos que podem coexistir e potencializar a virulência (co-infecções), complicando o diagnóstico, controle e manejo das doenças (JORGE *et al.*, 2010). Foram identificados dois casos de co-infecção entre *Giardia lamblia* e *Cystoisospora* spp. em um tatu-galinha e um zorrilho, e três casos envolvendo *Leishmania* spp. e *T. cruzi* em uma capivara, um graxaim-do-mato e um quati. Essas associações indicam não apenas a sobreposição de ciclos epidemiológicos, mas também possíveis interações imunológicas e ecológicas que podem modular a suscetibilidade dos hospedeiros (PARODI *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2018).

5.2 Patógenos em águas brutas

O monitoramento da contaminação fecal foi realizado por meio da contagem de colônias de bactérias após a semeadura, sendo que a detecção de pelo menos uma colônia em 100 µL da amostra já indica uma concentração que atinge ou excede o limite de 1.000 org/100 mL, conforme preconizado na Portaria MS nº 2.914/2011 (BRASIL, 2020). Este procedimento justifica o rigor do monitoramento exigido pela norma, sendo o bioindicador padrão para a pesquisa de enteroparasitos em águas para consumo humano e uso recreativo.

A *Escherichia coli* é comumente utilizada para evidenciar a poluição fecal e sua presença, com ênfase nos canais e arroios, demonstrou variações temporais e espaciais na contaminação (BRASIL, 2021). Observou-se a presença da bactéria em vários pontos durante as campanhas iniciais, seguida por uma posterior redução em locais como o Canal Santa Bárbara e o Canal São Gonçalo na quarta coleta. Essa variação sugere a influência de fatores como a diluição por fatores hidrodinâmicos, a remoção de material particulado contaminado, ou mudanças sazonais que afetam a

descarga de escoamento. Tais resultados ressaltam a necessidade de um monitoramento contínuo e sistemático para identificar com precisão as tendências e as possíveis fontes pontuais ou difusas de poluição (CONROY *et al.*, 2011).

A detecção de protozoários como *Giardia lamblia* e *Cystoisospora* spp. em diversos pontos das campanhas evidencia que estes organismos podem persistir nos corpos d'água mesmo quando, em alguns momentos, *E. coli* não foi detectada. No caso específico de *Giardia lamblia*, a sua presença contínua em pontos onde não houve detecção de *E. coli* sugere que o protocolo metodológico adotado pela FUNASA (BRASIL, 2020) pode carecer de sensibilidade ou de abrangência no que diz respeito à identificação deste patógeno. Este fato é especialmente preocupante, visto que *Giardia lamblia* é um agente patogênico de alta relevância epidemiológica, o que pode comprometer as estratégias de controle da qualidade da água e a saúde pública (BESEMER *et al.*, 2018). A similaridade na distribuição de *Cystoisospora* spp., detectada em um número semelhante de pontos nas primeiras coletas e em menor quantidade na quarta, contribui para o entendimento do comportamento desses protozoários sob diferentes condições ambientais e reforça a importância de se revisar e aperfeiçoar os métodos de detecção.

A ausência sistemática de detecção de *Cryptosporidium* spp. nas amostras, incluindo a fauna silvestre, deve ser interpretada com cautela. Embora o patógeno possa estar em concentrações abaixo do limite de detecção dos métodos, sua resistência estrutural é um fator crítico. Conforme reforça Sekikawa (2016), o oocisto robusto representa um grande obstáculo para a extração eficiente do DNA. Devido às características estruturais complexas do protozoário, existe a possibilidade de que os métodos empregados para a lise do oocisto, incluindo os reagentes de extração, tenham sido insuficientes, limitando a detecção e justificando a necessidade de investigações metodológicas adicionais para aprimorar a sensibilidade.

A divergência na detecção de fatores de contaminação entre diferentes campanhas e pontos amostrais ressalta a necessidade de metodologias robustas e padronizadas para a avaliação da qualidade das águas superficiais. A discrepância entre a detecção de *Giardia lamblia* e a ausência de *E. coli* em determinadas situações serve como um alerta para possíveis lacunas nos atuais protocolos adotados. Assim, há fundamento para a recomendação de uma revisão dos métodos e a implementação de técnicas complementares, como análises moleculares ou

imunocromatográficas, que podem oferecer maior sensibilidade e precisão na detecção dos protozoários de interesse sanitário.

Do exposto, este estudo oferece evidências de que a qualidade das águas na microrregião de Pelotas é comprometida por contaminação fecal, com uma distribuição espacial e temporal variável dos bioindicadores e protozoários. A presença persistente de *Giardia lamblia* mesmo em amostras negativas para *E. coli* evidencia possíveis limitações dos métodos atuais e destaca a importância de se aprimorar os protocolos de vigilância da qualidade da água. A ausência de patógenos na Praia do Laranjal, por sua vez, ressalta a complexidade dos processos hidrodinâmicos e a heterogeneidade ambiental, sugerindo a necessidade de abordagens localizadas para a gestão dos recursos hídricos. Esses achados têm implicações significativas para futuras pesquisas e para a formulação de políticas públicas que visem à mitigação dos riscos à saúde pública decorrentes do uso de recursos hídricos contaminados.

Tabela 3: Ocorrência e Distribuição Espaço-Temporal de Patógenos em Águas Brutas. O quadro resume a detecção dos protozoários zoonóticos e *E. coli* por ponto de coleta, apresentando os resultados das coletas de monitoramento realizadas no período de março a agosto de 2025.

Patógenos Estudados	Primeira Coleta 25/03/2025	Segunda Coleta 05/05/2025	Terceira Coleta 19/06/2025	Quarta Coleta 05/08/2025
<i>E. coli</i>	Arroio Moreira, Arroio Pelotas, Barragem Santa Barbara, Canal do Pepino, Canal Santa Barbara, Canal São Francisco, Canal São Gonçalo	Arroio Moreira, Arroio Pelotas, Barragem Santa Barbara, Canal do Pepino, Canal Santa Barbara, Canal São Francisco, Canal São Gonçalo	Arroio Moreira, Arroio Pelotas, Barragem Santa Barbara, Canal São Francisco, Canal São Gonçalo	Canal Santa Barbara, Canal São Gonçalo
<i>Giardia lamblia</i>	Arroio Pelotas, Canal Santa Barbara, Canal São Francisco, Canal do Pepino	Arroio Pelotas, Canal Santa Barbara, Canal São Francisco, Canal do Pepino	Arroio Pelotas, Canal Santa Barbara, Canal São Francisco, Canal do Pepino	Arroio Pelotas, Canal Santa Barbara, Canal São Francisco
<i>Cystoisospora</i> spp.	Arroio Pelotas, Canal do Pepino, Canal Santa Barbara, Canal São Francisco	Arroio Pelotas, Canal do Pepino, Canal Santa Barbara, Canal São Francisco	Arroio Pelotas, Canal Santa Barbara, Canal São Francisco	N/A
<i>Cryptosporidium</i> spp.	N/A	N/A	N/A	N/A

5.2.1 Influência de eventos pluviométricos

A variação temporal na detecção dos patógenos, principalmente *Giardia lamblia* e *Cystoisospora* spp., parece ter sido diretamente influenciada pelos eventos de precipitação concentrada. O volume de chuva, conforme pode-se averiguar na Figura 4, aumentou drasticamente entre as coletas (passando de 1,4 mm para mais de 147 mm e 180,4 mm nas campanhas subsequentes), com picos de precipitação que podem ter causado tanto o arraste de protozoários para os corpos hídricos quanto um efeito de diluição (BARTÁ *et al.*, 2021; CORDEIRO, 2016).

Notavelmente, buscou-se avaliar a influência da temperatura da água na detecção dos patógenos, porém, alterações significativas foram observadas apenas na última coleta. A redução acentuada de detecções nessa quarta campanha sugere que as precipitações volumosas imediatamente prévias à amostragem podem ter agido por força mecânica, dispersando ou varrendo os microrganismos e, consequentemente, alterando a concentração detectável.

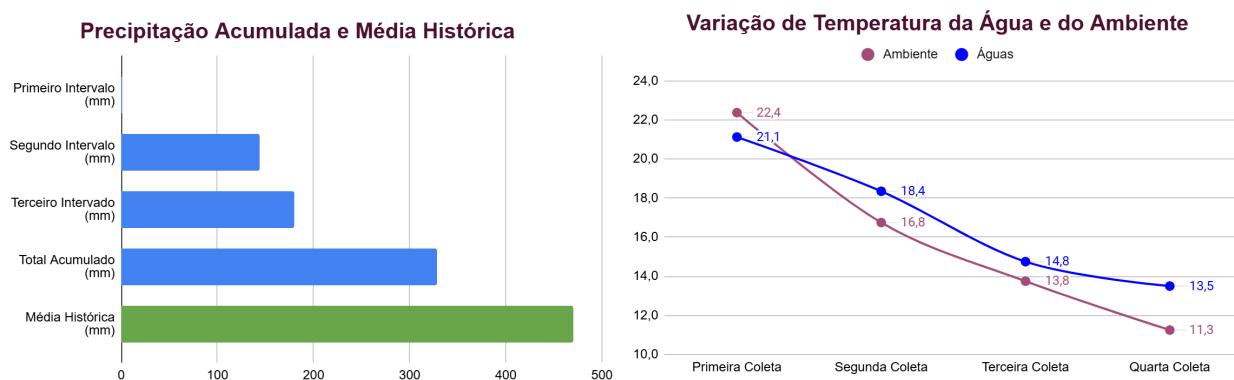


Figura 4: Caracterização físico-química dos pontos de coleta matutinas de água bruta em diferentes pontos da cidade de Pelotas-RS e em diferentes momentos do estudo, realizado entre Março e Agosto de 2025.

A redução acentuada na detecção de *Escherichia coli* e *Cystoisospora* spp. na última coleta pode ser explicada, em parte, pelas condições térmicas adversas, uma vez que a água registrava 13,5 °C, conforme dados apresentados na Figura 4, valor consideravelmente baixo se comparado a condições mais amenas. Em regimes aquáticos, a temperatura exerce papel crucial na modulação das reações bioquímicas e dos processos metabólicos dos microrganismos, influenciando tanto sua taxa de multiplicação quanto sua viabilidade Fantin-Cruz *et al.* (2011). Em temperaturas mais baixas, é comum observar uma diminuição na proliferação de bactérias como *E. coli*, devido à redução das

atividades metabólicas e enzimáticas que sustentam seu crescimento, e essa condição pode levar a uma menor carga bacteriana detectável na coluna d'água.

Ademais, o efeito mecânico das precipitações intensas, que ocorreram imediatamente antes da coleta, pode ter contribuído para a dispersão ou até mesmo o arraste desses microrganismos. Tais eventos podem causar não apenas um efeito de diluição, mas também favorecer a sedimentação dos protozoários, como as estruturas (por exemplo, oocistos) de *Cystoisospora* spp., dificultando sua detecção pelos métodos empregados. A combinação de fatores como a redução das taxas metabólicas em ambientes com temperatura de 13,5°C e os eventos de precipitação volumosa, pode resultar em concentrações de patógenos abaixo dos limites de detecção metodológica, justificando a observada redução nas detecções nesta última campanha (CARVALHO *et al.*, 2021).

5.3 Integração dos achados e implicações para a Saúde Única

Os resultados obtidos revelam uma rede epidemiológica complexa que conecta a fauna silvestre e os recursos hídricos ao longo de um amplo território — desde as rotas que ligam Pelotas-RS à Estação Ecológica Taim e às cidades de Santa Vitória do Palmar, Canguçu, Jaguarão e Bagé. Essa conexão geográfica e ecológica sustenta a circulação de múltiplos protozoários zoonóticos e indica o papel central do ambiente como interface de transmissão, evidenciando a importância da abordagem de Saúde Única.

A elevada prevalência de *Trypanosoma cruzi* (80% dos animais analisados) aponta para a existência de um ciclo enzoótico robusto, sustentado por uma ampla gama de hospedeiros, incluindo mamíferos de diferentes hábitos e nichos ecológicos, aves residentes e até um predador de topo como o falcão-peregrino. Esse perfil reforça a resiliência e a adaptabilidade do parasito, bem como a existência de múltiplos pontos potenciais de contato com animais domésticos e humanos, especialmente em áreas rurais e periurbanas (PARODI *et al.*, 2016).

A detecção de *Leishmania* spp. em quatro indivíduos — uma capivara na Estação Ecológica Taim e um graxaim-do-mato, um quati e um gambá-de-orelha-branca em Piratini — é particularmente relevante devido à baixa prevalência histórica da doença nessas localidades. No Taim, a ocorrência em capivara levanta hipóteses sobre o papel de espécies de grande porte e hábitos semi-aquáticos como potenciais reservatórios silvestres. Já em Piratini, região com

clima subtropical, invernos rigorosos e fragmentação de habitats, o registro em três espécies de hábitos distintos (carnívoro, onívoro e marsupial) sugere que alterações climáticas recentes, associadas a mudanças no uso do solo, podem estar expandindo as áreas de ocorrência de vetores flebotomíneos (SOARES *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018). Esses achados funcionam como sinal de alerta precoce para possível avanço geográfico do ciclo silvestre da leishmaniose no extremo sul do Brasil.

A presença de protozoários de transmissão fecal-oral (*Giardia lamblia* em 24% e *Cystoisospora* spp. em 20% dos animais) e sua detecção concomitante em múltiplos pontos de águas brutas reforçam a hipótese de que os corpos hídricos atuam como corredores epidemiológicos, interligando áreas naturais, rurais e urbanas. A sobreposição espacial de detecções em fauna e em pontos como o Arroio Pelotas, Canal Santa Bárbara e Canal São Francisco fortalece essa interpretação. A ausência de *Cryptosporidium* spp., tanto em fauna quanto na água, contrasta com análises prévias e sugere diferenças locais no perfil epidemiológico ou nas fontes predominantes de contaminação (COELHO *et al.*, 2016).

As co-infecções registradas — especialmente a associação *Leishmania* spp. + *T. cruzi* em capivara, graxaim-do-mato e quati — revelam a simultaneidade de exposições e a complexidade das interações parasitárias na fauna silvestre (PARODI *et al.*, 2016). Essa multiplicidade de agentes circulando nos mesmos hospedeiros aumenta o risco de amplificação epidemiológica e pode impactar negativamente a saúde dos animais, alterando padrões de comportamento e ecologia de transmissão. Nos recursos hídricos, a detecção generalizada de *E. coli* nas primeiras campanhas e a persistência de *Giardia lamblia* e *Cystoisospora* spp. ao longo das coletas indicam contaminação fecal difusa, possivelmente de origem mista (silvestre, doméstica e humana). As variações de detecção ao longo do tempo se correlacionam com eventos pluviométricos, incluindo a influência de um ciclone extratropical, sugerindo que a precipitação exerce duplo papel: promover o arraste de patógenos para os mananciais e, em eventos extremos, diluir ou dispersar esses microrganismos, reduzindo momentaneamente sua detecção (BARTÁ *et al.*, 2021).

O conjunto dos achados demonstra que as fronteiras entre saúde humana, animal e ambiental são permeáveis e dinâmicas. A circulação simultânea de protozoários vetoriais (*T. cruzi*, *Leishmania* spp.) e de transmissão hídrica (*Giardia lamblia*, *Cystoisospora* spp.) em uma rede ecológica interligada, modulada por

fatores climáticos e hidrológicos, demanda estratégias de vigilância integradas. A implementação de monitoramento contínuo, associado a análises entomológicas, avaliação de fluxos hidrológicos e estudos de movimentação da fauna, é essencial para antecipar surtos, mitigar riscos e apoiar políticas públicas alinhadas aos princípios da Saúde Única.

A investigação integrada na ecologia de doenças zoonóticas no Sul do Rio Grande do Sul revela um panorama de múltiplos riscos sobrepostos que contribuem para a compreensão da situação sanitária e epidemiológica regional. O risco hídrico está representado pela potencial contaminação de mananciais por enteroparasitos patógenos cuja morbidade está associada à qualidade do saneamento e ao tratamento da água. Estudos indicam que práticas inadequadas de manejo de esgoto e o impacto do escoamento agrícola e urbano promovem a dispersão de patógenos nas águas superficiais, aumentando a carga microbiana e os riscos à saúde (Aleruchi, 2025; Cesa *et al.*, 2015). Aleruchi *et al.* (2025) destacam que a influência do escoamento resultante de atividades urbanas e agrícolas pode elevar a contaminação de fontes hídricas, enquanto Cesa *et al.* (2015) correlacionam a incidência de doenças hídricas à deficiência na infraestrutura de saneamento, especialmente em contextos de vulnerabilidade socioambiental observados em regiões do Sul do Brasil.

Por outro lado, a presença de *Trypanosoma cruzi* em fauna silvestre indica um risco enzoótico significativo. Essa circulação, associada à utilização das rodovias como corredores de dispersão, aproxima o ciclo silvestre da Doença de Chagas das populações humanas, especialmente em áreas rurais, aumentando o risco de transmissão Tiwari *et al.* (2024). A mobilidade dos hospedeiros silvestres e sua capacidade de percorrer grandes distâncias criam um cenário em que a transmissão zoonótica pode ocorrer de maneira mais dinâmica, exigindo a consideração de fatores ambientais e epidemiológicos integrados.

Nesse contexto, a abordagem de Saúde Única torna-se essencial, pois permite a integração dos dados referentes à qualidade da água consumida e à presença de patógenos na fauna que compartilha o território. Tiwari *et al.* (2024) ressaltam a importância da vigilância ambiental integrada como parte de uma estratégia One Health, fundamental para aprimorar o monitoramento e a resposta rápida a surtos de doenças. Além disso, Mello *et al.* (2025) demonstram a importância de um abastecimento de água tratada para a promoção da saúde

pública, reforçando a necessidade de políticas públicas intersetoriais que conciliem saneamento, vigilância epidemiológica e manejo ambiental.

Dessa forma, a integração dos dados provenientes da análise de mananciais e da circulação de patógenos em fauna silvestre fornece um mapa de risco mais completo e acurado, permitindo a formulação de estratégias que mitiguem, de forma integrada, os múltiplos riscos zoonóticos presentes na região. Essa perspectiva multifacetada é imprescindível para subsidiar a implementação de políticas públicas eficazes, que promovam a melhoria dos sistemas de saneamento, fortaleçam as ações de vigilância e ampliem o manejo ambiental, contribuindo para a proteção da saúde humana e animal.

6 Manuscrito

Opportunistic Coccidiosis in Immunosuppressed Patients: An Overview of Diagnostic Invisibility in Brazil

Willian Cardoso Ferreira Zorrer^{1*} (ORCID: 0009-0005-3934-4331); Estefani Rinaldi¹ (ORCID: 0009-0008-7763-7524); Bibiana Rodrigues de Freitas¹ (ORCID: 0000-0003-4467-7497); Pedro Machado Medeiros de Albuquerque¹ (ORCID: 0000-0001-9311-6050); Rodrigo Casquero Cunha¹ (ORCID: 0000-0003-0145-0321); Fabio Raphael Pascotti Bruhn² (ORCID: 0000-0002-4191-965X)

¹ Veterinary Molecular Biology Laboratory – Federal University of Pelotas

² Zoonosis Control Center – Federal University of Pelotas

Submetido à revista *Journal of Tropical Medicine*.

Artigo de revisão submetido em 12 de agosto de 2025 sob o ID PIM-2025-0111

Preprint: DOI: 10.22541/au.175315888.85626276/v1

Fator de impacto: 2,5 (Q1) - Referências em formato *Vancouver*

Abstract:

Opportunistic infections caused by the protozoa *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* represent a challenge for public health, particularly in immunocompromised patients. In Brazil, a country with continental dimensions and socioeconomic diversity, the epidemiology of these intestinal coccidioses is complex and often underestimated. This review article aims to consolidate current knowledge on *Cryptosporidium* and *Cystoisospora* infections in immunocompromised individuals within the Brazilian context, addressing clinical manifestations, epidemiology, risk factors, diagnostic methods, treatment options, prevention and control strategies, and challenges related to underreporting. A thorough understanding of these aspects is crucial for improving health policies, optimizing clinical management, and reducing the morbidity and mortality associated with these parasitic diseases.

Keywords: *Cryptosporidium*, Immunosuppression, Underreporting, Public Health Surveillance.

Introduction

Intestinal coccidioses, caused by protozoa of the phylum Apicomplexa, such as *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* (formerly known as *Isospora belli*), are globally recognized as significant agents of diarrhea, especially in vulnerable populations^(1,2). In immunocompetent individuals, these infections typically present as acute, self-limiting diarrheal episodes. However, in patients with compromised immune systems—such as those living with HIV/AIDS, organ transplant recipients, or individuals undergoing immunosuppressive therapy or chemotherapy—these parasitic infections can lead to severe, chronic, and potentially fatal conditions, characterized by severe dehydration, intestinal malabsorption, and progressive malnutrition^(1, 10, 3).

In Brazil, the occurrence of these infections is influenced by a complex interplay of socioeconomic, environmental, and healthcare-related factors. Poor sanitation infrastructure in many regions, contamination of water and food, and proximity to animal reservoirs contribute to the spread of infectious oocysts⁽⁴⁾. Despite their clinical relevance, the true burden of cryptosporidiosis and cystoisosporiasis in immunosuppressed patients in Brazil remains poorly understood, partly due to diagnostic gaps that lead to underreporting.

This article reviews the scientific literature on *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* infections in immunosuppressed patients in Brazil, focusing on clinical presentation, epidemiology, risk factors, and challenges in underreporting, aiming to provide an updated epidemiological overview for public health.

Etiological Agents and Biological Cycle

The genus *Cryptosporidium* comprises several species, with *C. hominis* and *C. parvum* being the most frequently associated with human infections. Transmission occurs through ingestion of sporulated oocysts excreted in the feces of infected hosts, contaminating water, food, or via direct person-to-person or animal-to-person contact^(1, 10). The oocysts are highly resistant to environmental conditions and common disinfectants, such as chlorine.

Cystoisospora belli is a monoxenous protozoan, with humans as its only known host. Infection occurs through ingestion of mature oocysts present in water or food contaminated with human feces. The oocysts are excreted immature and require time in the environment to sporulate and become infectious⁽²⁾.

In both cases, after ingestion, sporozoites are released in the small intestine, invade enterocytes, and initiate cycles of asexual and sexual reproduction, culminating in the formation of new oocysts that are excreted in feces, perpetuating the cycle. In immunosuppressed individuals, replication can be continuous and intense, leading to chronic infection.

Epidemiology in Brazil Among Immunosuppressed Patients

The epidemiology of cryptosporidiosis and cystoisosporiasis in immunosuppressed patients in Brazil is heterogeneous, underestimated, and lacks comprehensive research. Most available studies focus on patients living with HIV/AIDS, who constitute the highest-risk group.

Prevalence and Geographic Distribution

Studies conducted in different regions of Brazil show significant variations in the prevalence of these infections. In HIV/AIDS patients, the prevalence of *Cryptosporidium* spp. can vary considerably. A study in Ribeirão Preto (SP) found a frequency of 6.4% for *Cryptosporidium* sp. and 4.4% for *C. belli* in HIV-positive patients (5). Another study in Rio Grande do Norte, involving hospitalized HIV/AIDS patients, also investigated the frequency of these coccidia, highlighting the lack of data, particularly in the Northeast region (4). A more recent study on the prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients in Brazil observed a significant association between non-adherence to antiretroviral therapy and the presence of these parasites (12).

The prevalence of *Cystoisospora belli* in HIV-positive patients in Brazil also varies, with reported rates ranging from 4.4% to 18% in different studies (6). Seasonality also appears to influence occurrence, with some studies suggesting higher frequencies of *Cryptosporidium* spp. during rainy months and *C. belli* during warm and humid months, although both microorganisms can remain viable in the environment for months due to their resistance to environmental conditions (5, 12).

Beyond HIV/AIDS patients, other immunosuppressed groups, such as organ transplant recipients and chemotherapy patients, are also at risk, though epidemiological data specific to these groups in Brazil are scarcer. Case reports, such as disseminated cryptosporidiosis in a child undergoing bone marrow transplantation, underscore the importance of these infections in such patients⁽¹¹⁾.

Risk Factors

The primary risk factor for severe and chronic forms of cryptosporidiosis and cystoisosporiasis is immunosuppression, particularly cellular immune deficiency. In HIV/AIDS patients, CD4+ T-cell counts below 200 cells/mm³, and especially under 50–100 cells/mm³, are strongly associated with increased risk of infection and severe disease^(4, 10). Non-adherence or failure of antiretroviral therapy (ART) is another critical factor⁽¹²⁾.

Other risk factors include poor socioeconomic and sanitary conditions, as lack of access to basic infrastructure, such as clean water and sanitation, increases exposure to oocysts. Additionally, contact with animals represents an important zoonotic transmission route for *Cryptosporidium* spp., especially in rural areas or for individuals in close contact with infected livestock or pets. Consumption of contaminated water and food is also relevant, with outbreaks of cryptosporidiosis linked to contaminated public or recreational water supplies documented in other countries—a risk in Brazil due to the oocysts' resistance to conventional water treatment⁽¹¹⁾. Finally, risky sexual practices, such as oral-anal transmission, may occur, particularly for *Cryptosporidium* spp.⁽⁴⁾.

Clinical Presentation in Immunosuppressed Patients

In immunosuppressed patients, the clinical presentation of cryptosporidiosis and cystoisosporiasis is typically more severe and prolonged than in immunocompetent individuals.

Cryptosporidiosis

The predominant manifestation is profuse, watery secretory diarrhea, which may persist for weeks, months, or even years if immunity is not restored. The diarrhea can lead to severe dehydration and electrolyte imbalances; intestinal malabsorption, resulting in significant weight loss and malnutrition; cramping abdominal pain, nausea, vomiting, and low-grade fever^(1, 10).

In cases of severe immunosuppression, cryptosporidiosis may disseminate to extraintestinal sites, such as the biliary tract (causing sclerosing cholangitis, acalculous cholecystitis), pancreas (pancreatitis), and respiratory tract (cough,

dyspnea)^(1, 10). *Cryptosporidium*-associated cholangiopathy is a severe complication with a guarded prognosis.

Cystoisosporiasis

Cystoisosporiasis in immunosuppressed individuals is also characterized by watery diarrhea, intermittent or continuous, often accompanied by abdominal pain, nausea, vomiting, anorexia, fever, and significant weight loss. Malabsorption and steatorrhea are common⁽³⁾. Unlike cryptosporidiosis, peripheral eosinophilia may be present in some patients with cystoisosporiasis⁽²⁾. Although rare, extraintestinal dissemination of *Cystoisospora belli* to lymph nodes, liver, and spleen has been described in AIDS patients.

The chronicity and severity of symptoms in both infections profoundly impact patients' quality of life, often necessitating hospitalization and intensive nutritional support.

Diagnosis

The diagnosis of cryptosporidiosis and cystoisosporiasis is not frequent due to high underreporting rates, gaps in patient screening and follow-up, and frequent misclassification as viral gastroenteritis. However, when properly performed, it relies on the detection of oocysts in stool or, in cases of extraintestinal involvement, in biopsy samples or other biological fluids.

Traditional Parasitological Methods

Light microscopy after specific staining techniques is the most commonly used diagnostic method in routine laboratory practice in Brazil. Modified acid-fast staining techniques, such as the Ziehl-Neelsen (Kinyoun) method, are the most common for visualizing *Cryptosporidium* spp. oocysts (which stain red/pink) and *Cystoisospora belli* oocysts (which also stain red/pink but are larger and more oval than *Cryptosporidium*, measuring 20–33 µm in length and 10–19 µm in width)⁽¹⁰⁾. Safranin-methylene blue is another staining option.

Cystoisospora belli oocysts can also be visualized in fresh or Lugol's iodine preparations but are better identified with permanent stains and exhibit autofluorescence under ultraviolet fluorescence microscopy⁽²⁾.

The sensitivity of stool parasitological exams can be increased with concentration methods, such as the Ritchie (formalin-ether) or Sheather (sugar flotation) techniques⁽⁴⁾. However, intermittent oocyst shedding, especially in cystoisosporiasis, may require the collection of multiple stool samples.

Immunological and Molecular Methods

Immunological tests, such as enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and direct immunofluorescence assays (DFA) for detecting *Cryptosporidium* spp. antigens in stool, offer higher sensitivity and specificity than traditional microscopy and are faster. However, their availability in Brazil's public health system is limited and rarely utilized.

Molecular techniques, such as polymerase chain reaction (PCR), are highly sensitive and specific, allowing not only parasite detection but also species and genotype identification of *Cryptosporidium*, which is important for epidemiological studies and understanding transmission routes (zoonotic vs. anthroponotic)⁽⁸⁾. Despite their utility, molecular methods are more expensive and complex, typically restricted to research centers and reference laboratories.

Diagnostic Challenges in Brazil

In Brazil, the diagnosis of coccidioses faces several challenges that significantly contribute to underreporting. Among these obstacles are low clinical suspicion, leading many physicians to not specifically request testing for these parasites. Additionally, there is a lack of standardization and quality control in microscopic exams, resulting in variability in diagnostic quality across laboratories. Limited access to more sensitive tests, such as immunological and molecular methods, particularly in the public healthcare system, further hampers accurate detection. Finally, the need for trained professionals is critical, as correct oocyst identification under microscopy requires considerable expertise.

Treatment

The management of cryptosporidiosis and cystoisosporiasis in immunosuppressed patients involves supportive measures, specific antimicrobial therapy, and, fundamentally, immune restoration.

Cryptosporidiosis

Currently, nitazoxanide is the only FDA-approved drug for treating *Cryptosporidium*-induced diarrhea in immunocompetent individuals and has been used in immunosuppressed patients. In HIV/AIDS patients, nitazoxanide's efficacy is higher in those with higher CD4+ counts and may help reduce parasite load and symptoms. However, in patients with severe immunosuppression (CD4+ < 50 cells/mm³), parasite eradication becomes difficult without immune recovery⁽¹⁾. Paromomycin has been used as an alternative but with limited efficacy.

Optimization of antiretroviral therapy (ART) is essential in treating cryptosporidiosis in HIV/AIDS patients, as immune recovery typically leads to infection resolution.

Cystoisosporiasis

The treatment of choice for cystoisosporiasis is sulfamethoxazole-trimethoprim (SMX-TMP)^(2, 3). The response is usually effective, with symptom improvement within days. In HIV/AIDS patients, after acute-phase treatment, secondary prophylaxis (maintenance therapy) with lower SMX-TMP doses is often necessary to prevent relapse, particularly if immunosuppression persists.

For patients allergic or intolerant to sulfonamides, alternatives such as pyrimethamine combined with folinic acid or ciprofloxacin may be considered, though ciprofloxacin is generally less effective than SMX-TMP⁽³⁾.

Supportive Measures

In both cases, supportive measures are essential and include oral or intravenous rehydration to correct dehydration and electrolyte imbalances. Adequate nutritional support is also crucial, potentially involving enteral or parenteral nutrition therapy to combat malabsorption and malnutrition. Additionally, antidiarrheal agents, such as loperamide, may be used for symptomatic control, though their use requires caution and medical supervision⁽⁶⁾.

Underreporting

Underreporting of cryptosporidiosis and cystoisosporiasis in Brazil is a multifactorial problem of great relevance, compromising accurate estimates of disease incidence and, consequently, the planning and implementation of effective control measures⁽⁷⁾.

First, the insidious nature of these diseases poses a challenge, as diarrheal episodes are often misattributed to more prevalent or known causes, leading to missed requests for coproparasitological or other diagnostic tests for intestinal coccidia⁽⁸⁾. Another key factor lies in diagnostic limitations. As previously discussed, the heavy reliance on traditional microscopic methods—which require not only adequate equipment but also high expertise—combined with limited availability and access to more sensitive and specific diagnostic tests, such as molecular assays, in many regions of the country, significantly contributes to underdiagnosis and, consequently, underreporting⁽⁹⁾.

Moreover, the lack of awareness and low clinical suspicion among healthcare professionals regarding the importance of actively investigating these infections, especially in at-risk groups beyond those with advanced HIV/AIDS—such as transplant recipients, oncology patients, or those on other immunosuppressive therapies—constitutes a significant barrier⁽¹⁰⁾. Additionally, the fragility of the epidemiological surveillance system for these specific parasitic diseases is a concern. Although AIDS is a notifiable condition, associated opportunistic infections, including cryptosporidiosis and cystoisosporiasis, are not always reported systematically, uniformly, or in detail. Notably, there is no specific, nationally unified epidemiological surveillance system for these coccidiosis that comprehensively covers all immunosuppressed patient profiles⁽¹¹⁾.

Finally, the scarcity of robust prevalence studies with national or even regional coverage hinders the construction of a reliable epidemiological overview. Many available surveys are geographically localized or focus on very specific populations, as demonstrated by Moura⁽⁴⁾ and other isolated studies like Ferreira & Almeida⁽¹⁰⁾, preventing generalization of data to the rest of the country.

In this context, overcoming underreporting of cryptosporidiosis and cystoisosporiasis in Brazil requires a multifaceted and coordinated approach. Such an approach must include strengthening epidemiological surveillance systems, improving reporting workflows; enhancing laboratory capacity and quality, including expanded access to more accurate diagnostic methods; continuous training and awareness-raising for healthcare professionals to improve suspicion and investigation; and the effective routine inclusion of these parasites in the diagnostic workup for chronic or persistent diarrhea, particularly in all immunosuppressed patient groups⁽¹²⁾.

Prevention and Control

Prevention and control of cryptosporidiosis and cystoisosporiasis in immunosuppressed patients require an integrated approach, with a primary focus on optimizing host immunity, especially in HIV/AIDS patients through effective antiretroviral therapy (ART). Chemoprophylaxis with sulfamethoxazole-trimethoprim (SMX-TMP), indicated for other conditions, may offer additional protection against cystoisosporiasis in severely immunosuppressed individuals.

Concurrently, rigorous personal and food hygiene measures are essential, including frequent handwashing, consumption of treated water—noting *Cryptosporidium*'s resistance to routine chlorination—and properly cleaned and cooked foods, as well as careful handling of animals to mitigate zoonotic transmission. At the community level, investment in basic sanitation and sewage treatment is critical to reduce environmental contamination by oocysts. Health education, targeting immunosuppressed patients and their caregivers on risks and preventive practices, complements these strategies.

In Brazil, although ministerial guidelines exist for managing opportunistic infections in HIV/AIDS patients, the effective implementation of environmental control measures and universal access to accurate diagnostics remain significant challenges.

Socioeconomic Impact

The socioeconomic impact of cryptosporidiosis and cystoisosporiasis in immunosuppressed patients in Brazil is considerable, though often underestimated due to underreporting. This impact manifests through high direct costs to the healthcare system, including expenses related to consultations, tests, medications, and prolonged hospitalizations, as well as significant indirect costs from lost productivity and premature mortality. Additionally, chronic diarrhea and associated symptoms severely compromise patients' and their families' quality of life. Outbreaks, particularly waterborne cryptosporidiosis, can also incur high costs for epidemiological investigations and emergency control measures. Thus, reducing the burden of these diseases through effective prevention and control strategies represents substantial potential savings for Brazil's healthcare system and society at large.

Current Challenges and Strategic Actions for the Future

Infections caused by *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* remain a significant challenge for the health of immunosuppressed patients in Brazil, often resulting in severe and debilitating clinical presentations. The true epidemiological scale of these parasitic diseases remains partially understood, a direct reflection of underreporting and the heterogeneity of available studies⁽⁷⁾.

To advance the fight against these parasitoses in the Brazilian context, the implementation of coordinated and strategic actions is imperative. This includes, fundamentally, strengthening epidemiological surveillance by establishing more efficient and comprehensive reporting systems and substantially improving national diagnostic capacity. Such improvement involves not only expanding access to more sensitive and specific methods in the public healthcare network but also ensuring continuous training for laboratory professionals, as advocated by health guidelines⁽⁹⁾.

Parallelly, fostering research is crucial, encouraging multicenter epidemiological studies with standardized methodologies to more accurately characterize the prevalence, distribution, and risk factors associated with these infections across diverse immunosuppressed groups and regions of the country, including investigations into the genetic diversity of circulating *Cryptosporidium* species, as highlighted in regional studies⁽¹⁰⁾. Continuous health education, aimed at both training professionals for improved clinical suspicion and management⁽¹⁰⁾ and guiding patients on preventive measures, is another essential pillar.

Additionally, effective public policies promoting consistent investments in basic sanitation and ensuring water supply quality are indispensable. Finally, while immune restoration is a key component of treatment, the search for more effective and safer antiparasitic agents for severely immunosuppressed patients must remain a priority in clinical research.

An integrated and synergistic approach to these multiple fronts is essential to effectively reduce the morbidity and mortality associated with cryptosporidiosis and cystoisosporiasis in immunosuppressed patients in Brazil. Such efforts would not only improve the quality of life for these individuals but also alleviate the considerable burden these infections place on the healthcare system⁽¹¹⁾.

References

1. Bonsere WCP, Mioranza SL, Fariña LO, Santos KC, Ayala TS. Surtos de criptosporidiose em humanos: uma revisão sistemática. *Rev Bras Meio Ambiente*. 2020;8(2).
2. Noor MA, et al. *Cystoisospora belli* infection: a mini review. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2019;9(5):181-6.
3. Cunha GV, Paz LB, Azenha EM, Junior RS, Albernaz DAS. Principais protozoários entéricos oportunistas associados à AIDS: *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis* e *Microsporidia*. *Rev Aten Saúde*. 2018;16(55):99-107.
4. Moura LNS, et al. Frequência de *Cryptosporidium* spp. e *Cystoisospora* spp. em pacientes HIV/AIDS internados no Hospital Giselda Trigueiro, Natal/RN [Trabalho de Conclusão de Curso]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2017.
5. Instituto Adolfo Lutz. Frequência de *Cryptosporidium* sp e *Isospora belli* em pacientes soropositivos para o HIV na região de Ribeirão Preto, SP. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2000;60(1):45-9.
6. Assis DC, et al. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55(3):149-54.
7. Santos FP, Lima CA. Desafios da vigilância de coccidioses intestinais no Brasil. *Rev Bras Epidemiol*. 2021;24:e210034.
8. Oliveira Filho AN, Barreto MS, Gomes TA. Etiologia e diagnóstico diferencial de diarréias persistentes em pacientes imunocomprometidos. *J Bras Patol Med Lab*. 2019;55(3):280-95.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância em saúde. 6^a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2022.
10. Ferreira JC, Almeida RP. Conhecimento e práticas de médicos da atenção primária sobre o manejo de enteroparasitos oportunistas. *Cad Saude Publica*. 2020;36(5):e00123419.
11. Teixeira MG, Costa MCN, Carmo EH. Vigilância epidemiológica no Brasil: avanços e desafios. *Cien Saude Colet*. 2018;23(6):1823-30.
12. Sociedade Brasileira de Infectologia. Recomendações para o manejo de infecções oportunistas em pacientes com HIV/AIDS. São Paulo: SBI; 2023.

7 Considerações Finais

As análises conduzidas neste estudo confirmam a relevância da abordagem de Saúde Única para a vigilância de patógenos, alcançando o objetivo geral de avaliar a ocorrência de protozoários zoonóticos em fauna silvestre e águas brutas no Sul do Rio Grande do Sul. Os resultados evidenciam um cenário de riscos sobrepostos, reforçando a interdependência entre a saúde animal, humana e ambiental na região (Tiwari *et al.*, 2024).

No componente da fauna silvestre, a detecção molecular foi fundamental. A alta prevalência de *Trypanosoma cruzi* (80% dos animais analisados) evidencia a manutenção de um ciclo enzoótico robusto e consolidado, abrangendo uma ampla diversidade de hospedeiros e indicando um potencial risco de transbordamento zoonótico para animais domésticos e humanos (Tiwari *et al.*, 2024). De igual modo, a detecção de *Leishmania* spp. em localidades tradicionalmente classificadas como de baixa prevalência é um achado importante que sinaliza uma possível expansão geográfica do ciclo silvestre no extremo sul do Brasil.

Quanto à matriz hídrica do estudo, a identificação contínua de protozoários de veiculado por este meio, como *Giardia lamblia*, em múltiplos pontos das águas brutas sublinha a urgência de integrar o controle de qualidade da água e a infraestrutura de saneamento às estratégias de prevenção de doenças (Cesa *et al.*, 2015). A não detecção sistemática de *Cryptosporidium* spp. serve como um dado crucial para refinar as hipóteses sobre as fontes de contaminação ambiental e direcionar o aprimoramento dos protocolos metodológicos, dada a reconhecida resistência estrutural desse oocisto (Moussa *et al.*, 2023).

Em síntese, a investigação simultânea da fauna silvestre e dos recursos hídricos permitiu gerar um mapa de risco muito mais completo e acurado, que contempla tanto o risco enzoótico quanto o risco hídrico. Os dados aqui apresentados oferecem subsídios científicos concretos para a formulação de políticas públicas e programas de vigilância que integrem a interface ambiente-animal-homem, direcionando ações de saneamento, vigilância epidemiológica e manejo ambiental para a mitigação integrada dos múltiplos riscos zoonóticos presentes na região.

8 Referências Bibliográficas

- ALEMÁN-SANTOS, M. *et al.* Salud humana, animal y medio ambiente, la forma ideal de abordar el estudio de la leishmaniasis bajo el concepto una salud. **Revista MVZ Córdoba**, v. 30, n. 3, e3992, Colômbia, 2025.
- ALERUCHI, O. Impact of agricultural and urban runoff on waterborne pathogen contamination. **Eu J Sci Res Rev**, v. 2, n. 3, p. 104,
- AZAMI-CONESA, I. *et al.* A systematic review (1990–2021) of wild animals infected with zoonotic *Leishmania*. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1101, 2021.
- BERTOL, O. J. *et al.* Perdas de solo e água e qualidade do escoamento superficial associadas à erosão entre sulcos em área cultivada sob semeadura direta e submetida às adubações mineral e orgânica. **Revista Brasileira De Ciência Do Solo**, v. 31, n. 4, p. 781-792, 2007.
- BÁRTA, R. L. *et al.* Qualidade da água para consumo humano no Brasil: revisão integrativa da literatura. **Vigilância Sanitária em Debate**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p. 74-85, 2021.
- BESEMER, K. *et al.* Evaluation of waterborne protozoan pathogens and their detection methods: A review. **Journal of Water and Health**, v. 16, n. 2, p. 133-145, 2018.
- BRASIL. Fundação Nacional de Saúde, 2020. **Manual prático de análise de água**. 4^a ed. Brasília: Funasa.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2021.
- BRENTANO, B.; FOLLMANN, F. M.; FOLETO, E. M. Contextualização das unidades de conservação no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência E Natura**, v. 37, n. 3, 2015.
- CALDART, E.T. *et al.* Evaluation of an active and early surveillance methodology for visceral leishmaniasis by molecular detection in road-killed wild fauna. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.30, n.2, 2021.
- CARVALHO, R. F. *et al.* Impactos hidrodinâmicos e qualidade da água: um estudo de caso em corpos hídricos urbanos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 24, n. 3, p. 456-466, 2019.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Parasites - Cryptosporidiosis (also known as "Crypto"). Atlanta: **CDC**, 2024.
- CESA, M.; FONGARO, G.; BARARDI, C. Waterborne diseases classification and relationship with social-environmental factors in florianópolis city – southern brazil. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 2, p. 340-348, 2015.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomiae humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.
- COELHO, W. *et al.* Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros mantidos sob dois diferentes sistemas de manejo. **Colloquium Agrariae**, v. 12, p. 82-86, 2016..

- CORDEIRO, Ana Paula Assumpção. Tendências Climáticas das Temperaturas do Ar no Estado do Rio Grande do Sul, Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 9, n. 3, p. 868–880, 2016.
- CORTEZ, M.R. et al. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): ecology of the transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolívia. **Experimental Parasitology**, v. 114, p. 305-313, 2006.
- COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.
- COURA, J. R. et al. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, p. S6-S7, 2010.
- DIAS, C. D. C. et al. Levantamento de vertebrados silvestres mortos por atropelamento em rodovia estadual do brasil. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 9, n. 3, p. 229-238, 2021.
- DIAS, G. A. et al. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1291-1300, 2008.
- EL TAI, N. O. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94(5), p. 575–579. 2000.
- EMBRAPA PECUÁRIA SUL. Integração lavoura-pecuária-floresta em sistemas de produção de leite na Região Sul do Brasil. **EMBRAPA**. Bagé, RS: Embrapa, 2022.
- FANTIN-CRUZ, I. et al. Regime térmico em águas correntes e sua importância na estrutura do habitat e na biologia de organismos aquáticos. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v. 12, n. 36, p. 16291, dez. 2011.
- FAYER, R.. *Cryptosporidium*: a waterborne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.37-56, 2004.
- FEITOSA, G. et al. High prevalence of giardiasis and strongyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 339-343, 2004.
- FENG, Y. et al. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 110-140, 2011.
- FERREIRA, V.; SILVA, M. O clima da bacia do Rio Jequitinhonha, em Minas Gerais: subsídios para a gestão de recursos hídricos. **Revista Brasileira De Geografia Física**, v. 5, n. 2, p. 302-319, 2012.
- FIGUEIREDO, F.F. et al. Canine visceral leishmaniasis: two autochthonous cases in Florianópolis Municipality, Santa Catarina State, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, p. 1026, 2012.
- FONSECA, E. O. et al. Prevalência e fatores de risco para enteroparasitoses em uma população quilombola do estado do Espírito Santo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 2, p. 238-244, 2014.
- GEBREYES, W. A. et al. The global One Health paradigm: challenges and opportunities for tackling infectious diseases at the human, animal, and environment interface in low-resource settings. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, e3257, 2014.

- GOMES, L. d. P. et al. Medidas de mitigação ao atropelamento de fauna em rodovias federais concedidas no brasil. **Heringeriana**, v. 13, n. 1, p. 10-20, 2019
- GONÇALVES, E. M. et al. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* in children from São Paulo, Brazil. **Clinics**, v. 61, n. 2, p. 119-126, 2006.
- GONTIJO, B. et al. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 36, p. 71-80, 2003.
- GROTT, S. C. et al. Detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água bruta das estações de tratamento no município de Blumenau, SC, Brasil. **Revista Ambiente & Água**, v. 11, n. 3, p. 689-701, 2016.
- GUY, R. A. et al. Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5178-5185, set. 2003.
- HALLIEZ, M. C. et al. Extra-intestinal and long-term consequences of *Giardia duodenalis* infections. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 47, p. 8974–8985, 2013.
- HARRIS, J.; PETRY, F. *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 839, 1999.
- HIRSCHMANN, L. C. et al. Clinical and hematological evaluation of leishmaniasis serum-positive dogs in rio grande do sul. **Science and Animal Health**, v. 4, n. 2, p. 179, 2017.
- HOPKINS, R. M. et al. Ribosomal RNA Sequencing Reveals Differences between the Genotypes of *Giardia* Isolates Recovered from Humans and Dogs Living in the Same Locality. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 1, p. 44-51, 1997.
- JAIN, S. et al. **Leishmaniasis: background information**. World Health Organization, 2010.
- JANSEN, A. M. et al. The role of wild and domestic mammals in the ubiquity of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 8, e180126, 2018.
- JORGE, Rodrigo S. P. et al. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. **Interações Ecológicas e Dinâmica de Doenças**, v. 14, n. 3, 2010.
- JÚNIOR, B. A. R. et al. A determinação de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em água e relevância: revisão de literatura. In: Congresso Brasileiro de Saúde, 2., 2021. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, 2021.
- KONO, I. S. et al. Distribuição geográfica sul brasileira de *migonemyia migonei* (diptera: psychodidae), um vetor putativo de *leishmania infantum* (kinetoplastida: trypanosomatidae): uma revisão sistemática. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 44, n. 1, p. 61-72, 2023.
- KNIGHT, C. A. et al. Leishmaniasis: recent epidemiological studies in the Middle East. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 1052478, 2023.
- L TAI, N. O. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 575-579, 2000.

- LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, v. 321, n. 1207, p. 389-404, 1988.
- LEONEL, J. A. F. et al. Species, natural *Leishmania* spp. detection and blood meal sources of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in peridomestic from a leishmaniasis endemic area of Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 2024, n. 1, 9932530, 2024.
- MARTÍ-MARCO, A. et al. Molecular detection and epidemiology of potentially zoonotic *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in wild boar (*Sus scrofa*) from Eastern Spain. *Animals*, v. 13, n. 15, 2501, 2023.
- MATZENAUER, R.; RADIN, B.; MALUF, J. R. T. O fenômeno ENOS e o regime de chuvas no Rio Grande do Sul. *Agrometeoros*, v. 25, n. 2, 2018.
- MEDEIROS, R. M. d. et al. O El Niño e a La Niña e suas influências no clima de Bom Jesus, Piauí – Brasil. *RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar*, v. 2, n. 6, e26484, 2021.
- MELO, M. V.; VEGA, W. H. O.; ANDRADE, R. L. D. Médico veterinário: promovendo a saúde única na prevenção de zoonoses, em Sobral-CE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SAÚDE PÚBLICA ON-LINE, 3., 2024. Anais do III Congresso Brasileiro de Saúde Pública on-Line. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, v. 4, n. 4, 2024.
- MELLO, G. et al. O impacto do abastecimento de água tratada na saúde pública. *Revista Multidisciplinar Do Nordeste Mineiro*, v. 12, n. 1, p. 1-19, 2025.
- MEWES, P. M. d. S. et al. Leishmaniose visceral e tegumentar no brasil: desafios. *Asclepius International Journal of Scientific Health Science*, v. 4, n. 6, p. 355-364, 2025.
- MINUZZI, R. B.; FREDERICO, C. d. A. Variabilidade de ondas de calor e a relação com o ENOS Modoki e Canônico em Santa Catarina. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, v. 2, n. 4, p. 421-429, 2017.
- MOUSSA, A. et al. Fate of cryptosporidium and giardia through conventional and compact drinking water treatment plants. *Research Square*, 2023
- NARDO, M. B. et al. Programa de conscientização da população sobre o destino adequado dos dejetos fecais de animais em vias e logradouros públicos e exames laboratoriais. *Revista Ciência Em Extensão*, v. 9, n. 3, p. 181-182, 2013.
- OLIVERA, M. P. M. Enfoque “one health” como estrategia integral para el control de enfermedades metaxénicas. *Revista Cientifica Internacional De Ciencias De La Salud*, v. 2, n. 1, p. 5-6, 2025.
- OSEK, J. Development of a multiplex PCR approach for the identification of *Shiga* toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, p. 1217-1225, 2003.
- OSMARI, V. et al. Fauna and seasonality of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from a leishmaniasis transmission area in the central region of Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 33, n. 3, 2024.
- PARODI, C.; GARCÍA BUSTOS, M. F.; BARRIO, A.; et al. American tegumentary leishmaniasis: T-cell differentiation profile of cutaneous and mucosal forms—co-infection with *Trypanosoma cruzi*. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 205, p. 353-369, 2016.

- PEIXÔTO, A. M. et al. **Pesquisa de tripanossomatídeos em carapatos da região do distrito federal**. Programa De Iniciação Científica - PIC/UniCEUB - Relatórios De Pesquisa, 2022.
- PRADELLA, G. D. et al. Identification of *Leishmania* spp. in horses and a dog from rural areas of Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 41, n. 6, p. 2687-2694, 2020.
- PRATA, Á. et al. Os primórdios da doença. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, supl. 2, p. 6-11, 2011.
- PUMIPUNTU, N.; PIRATAE, S. Cryptosporidiosis: a zoonotic disease concern. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 681-686, 2018.
- RABINOWITZ, P. M. et al. Toward a an 'One Health' research and practice. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 32, n. 2, p. 371-382, 2013.
- RAPELLO, A. et al. Enzootic transmission of *Leishmania* spp. in gallery forests of the Brazilian Cerrado. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 33, n. 4, 2024.
- READY, P. D.; ROGERS, M. E. Behaviour of sandflies infected with *Leishmania*. In: G. M. W. T. C. VAN DER WAAIJ, et al. **Ecology of Parasite-Vector Interactions**.: Wageningen Academic Publishers, p. 167-178, 2013.
- REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- RIO GRANDE DO SUL. Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS). **Nota Informativa DVE/CEVS n. 14/2023**. Porto Alegre, RS: CEVS, 2023.
- ROBERT-GANGNEUX, F. et al. Improvement of the diagnosis of intestinal protozoa using a multiplex qPCR strategy compared to classical microscopy: a prospective study on 3,500 stool samples over 3 years. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 63, n. 5, 2025.
- SAMARASINGHE, B. et al. Phylogenetic analysis of *Cystoisospora* species at the rRNA ITS1 locus and development of a PCR-RFLP assay. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 592-595, 2008.
- SAVIOLI, L. et al. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.
- SCHIJMAN, A. G. et al. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, e931, jan. 2011.
- SEKIKAWA, T. A new immunomagnetic bead separation–surfactant extraction treatment protocol for rapid and sensitive quantitative pcr detection of cryptosporidium parvum dna. **Water Supply**, v. 17, n. 1, p. 161-168, 2016.
- SILVA, T. da. **Prevalência de enteroparasitoses no Brasil: uma revisão dos últimos 20 anos**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022.
- SILVA, É. F. et al.. Soroprevalência da infecção leptospiral em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) abatidas em um frigorífico do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 174–176, fev. 2009.

- SOARES, V. B. *et al.* Vigilância epidemiológica da leishmaniose tegumentar: análise territorial local. **Rev Saude Publica.** 2017.
- SOUZA, C. S. A. de. **Análise temporal, espacial e fatores associados à mortalidade por leishmaniose tegumentar no Brasil.** Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva. Belo Horizonte, 2018.
- THOMPSON, R. C. A. *et al.* *Giardia* and *Cryptosporidium* in pets and people: The plot thickens. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 6, p. 419-421, 2017.
- TIWARI, A. *et al.* **Strengthening pathogen and antimicrobial resistance surveillance by environmental monitoring in sub-saharan africa: a stakeholder survey.** Preprints, 2024.
- TORRICO, K. J. **Ocorrência e identificação de protozoários gastrintestinais em gatos da cidade de Londrina, Paraná.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (American trypanosomiasis).** Geneva: WHO, 2024.
- XIAO, L. *et al.* Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small subunit ribosomal RNA gene locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1578-1583, 1999.
- ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.

9 Materiais Suplementares

9.1 Plantel de animais silvestres coletados nas rodovias do Sul do Rio Grande do Sul, informando coordenadas e protozoários detectados.

Animal	Espécie	Localização	<i>Leishmania</i> spp.	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Trypanosoma</i> spp.	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Cystoisospora</i> spp.
Gambá Orelha-Branca 1	<i>Didelphis albiventris</i>	-31,8678901S -52,3230582W	Não Detectado	Detetado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Detetado
Falcão Peregrino	<i>Falco peregrinus</i>	-32,6473396S -52,5862587W	Não Detectado	Detetado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Mão Pelada 1	<i>Procyon cancrivorus</i>	-32,6978728S -52,6196747W	Não detectado	Não Detectado	Detetado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Mão Pelada 2	<i>Procyon cancrivorus</i>	-32,8791541S -52,7178821W	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Tatu galinha 1	<i>Dasypus novemcinctus</i>	31°35'21.5"S 52°31'57.0"W	Não Detectado	Detetado	Detetado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Graxaim do Mato	<i>Cerdocyon thous</i>	31°42'08.2"S 52°24'45.9"W	Não Detectado	Detetado	Detetado	Detetado	Não Detectado	Não Detectado
Cágado Cinza	<i>Phrynops Hilari</i>	31°46'27.2"S 52°21'38.0"W	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Detetado
Tatu galinha 2	<i>Dasypus novemcinctus</i>	31°40'25.8"S 52°27'23.4"W	Não Detectado	Detetado	Detetado	Detetado	Não Detectado	Detetado
Saracura do Mato 1	<i>Aramides saracura</i>	31°47'49.6"S 52°29'22.0"W	Não Detectado	Detetado	Não Detectado	Detetado	Não Detectado	Não Detectado
Zorrilho 1	<i>Conepatus chinga</i>	31°51'42.8"S 52°36'03.1"W	Não Detectado	Detetado	Detetado	Não Detectado	Não Detectado	Detetado
Saracura do Mato 2	<i>Aramides saracura</i>	31°46'36.6"S 52°24'57.0"W	Não Detectado	Detetado	Detetado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado

Rato do Banhado	<i>Myocastor coypus</i>	31°44' 26,29."S 52°31'6.639" W	Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Tachã-Cinzenta	<i>Chauna torquata</i>	31°48'26.413"S 52°19'16.55" W	Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Zorrilho 2	<i>Conepatus chinga</i>	32°24'25.366"S 52°33'35.891"W	Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Detectado
Gambá Orelha-Branca 2	<i>Didelphis albiventris</i>	31°47'50.8"S 52°24'27.7"W	Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Gambá Orelha-Branca 3	<i>Didelphis albiventris</i>	31°46'34.1"S 52°24'57.7"W	Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Gambá Orelha-Branca 4	<i>Didelphis albiventris</i>	31°48'05.2"S 52°24'46.9"W	Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Capivara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	32°32'19.3"S 52°32'19.5"W	Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Capivara 2	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	32°23'10.6"S 52°26'05.3"W	Detectado	Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Graxaim do Mato 2	<i>Cerdocyon thous</i>	31°18'02.1"S 54°02'45.3"W	Detectado	Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Veado Campeiro	<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	31°42'08.4"S 52°58'49.3"W	Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Quati	<i>Nasua nasua</i>	31°38'20.4"S 53°09'30.7"W	Detectado	Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Capivara 3	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	32°24'02.0"S 52°25'50.4"W	Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Capivara 4	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	32°21'35.0"S 52°09'49.5"W	Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Detectado	Não Detectado	Não Detectado
Feto Capivara 4	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	32°21'35.0"S 52°09'49.5"W	Não Detectado					