
PARASITOLOGIA AMBIENTAL:

MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO E DETECÇÃO

DE *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp.

EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Regina Maura Bueno Franco, Nilson Branco e Diego Averaldo Guiguet Leal¹

RESUMO

A transmissão de protozoários patogênicos pela água é um dos mais relevantes problemas de saúde pública na atualidade. Numerosos surtos epidêmicos causados pelos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* ocorreram ao redor do mundo em passado recente. Entretanto, os métodos utilizados para a detecção de cistos e oocistos em amostras de água são influenciados por características físico-químicas da matriz de água, como a turbidez. Esta revisão apresenta uma análise crítica das diferentes metodologias de concentração de cistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de águas destinadas ao consumo humano. A implantação do monitoramento desses protozoários é uma necessidade no Brasil dada a recente revisão da Portaria nº 518 do Ministério da Saúde.

DESCRITORES: Água. *Cryptosporidium*. *Giardia*. Métodos de Detecção.

ABSTRACT

Environmental Parasitology: Methods of concentration and detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in water samples

The transmission of waterborne pathogenic protozoa is one of the most relevant public health problems nowadays. Numerous epidemic outbreaks caused by *Giardia* and *Cryptosporidium* have occurred worldwide in the recent past. However, the methods used for the detection of cysts and oocysts in water samples are influenced by physico-chemical characteristics of water matrix such as turbidity. This review presents a critical analysis of the different concentration methodologies for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water samples destined for human consumption. The implementation of the monitoring of these protozoa is needed in Brazil considering the recent revision of the Ministerial Decree n.518.

KEY WORDS: Water. *Cryptosporidium*. *Giardia*. Detection Methods.

1 Laboratório de Protozoologia, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

Endereço para correspondência: Regina Maura Bueno Franco. E-mail: mfranco@unicamp.br

Recebido para publicação em: 4/4/2012. Revisto em: 29/4/2012. Aceito em: 12/5/2012.

INTRODUÇÃO

O desaguamento de esgotos domésticos não tratados ou tratados nos mananciais utilizados para abastecimento representa uma ameaça à saúde humana e animal. Uma vez contaminada, a água atua como uma eficiente veiculadora de patógenos em razão de sua grande capacidade de dispersão, do uso abrangente e consumo obrigatório (Branco, 2002).

Esta questão de saúde pública não é uma preocupação exclusiva dos países em desenvolvimento com infraestrutura sanitária deficitária; as nações desenvolvidas também enfrentam problemas relacionados à ocorrência de surtos epidêmicos de doenças de transmissão pela água, apesar de possuírem elevado padrão de abastecimento urbano e tratamento de esgoto (Craun et al., 1998).

De acordo com Gale e Stanfield (2000), os protozoários patogênicos e os vírus vêm se tornando os agentes mais preocupantes envolvidos na transmissão de doenças de veiculação hídrica, uma vez que esses organismos são mais resistentes às condições adversas ambientais que as bactérias e são também capazes de causar infecções mesmo com baixas doses infectantes. Os parasitos constituem uma importante causa de surtos epidêmicos de transmissão pela água: nos últimos 28 anos, ocorreram 524 episódios em todo o mundo, destacando-se o período compreendido entre 1984 e 2004 (Karanis et al., 2007) e, posteriormente, de janeiro de 2004 a dezembro de 2010 (Baldursson & Karanis, 2011), com 325 e 199 surtos epidêmicos, respectivamente. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foram os principais protozoários incriminados como agentes etiológicos identificados nestes surtos (Figura 1).

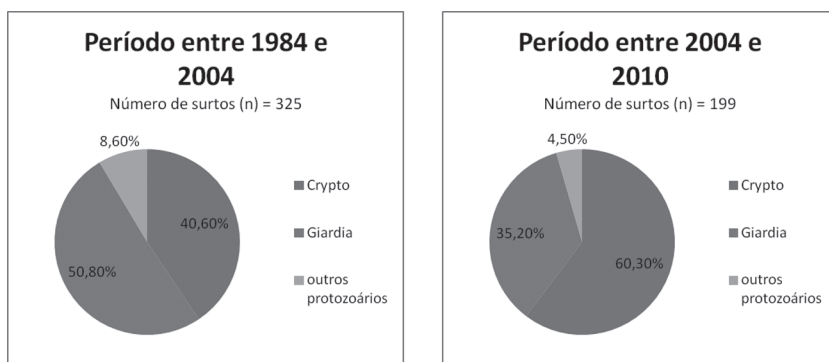


Figura 1. Número total de surtos epidêmicos de transmissão hídrica e porcentagem de surtos ocasionados por *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e outros protozoários no período de 1984 a 2010.

Diante deste cenário, conclui-se que são necessários métodos de detecção rápidos e efetivos para avaliar a ocorrência e determinar a infectividade e a espécie desses protozoários tanto na água bruta, captada para consumo humano, como em amostras de água tratada. Tais avaliações poderão fornecer subsídios para a tomada de decisões em saúde pública no que se refere ao tratamento da água, à contaminação dos mananciais e à avaliação de riscos à saúde humana. Entretanto, a pesquisa de oocistos e cistos em suprimentos de águas naturais representa um desafio, pois as metodologias empregadas para esse fim estão sujeitas a limitações como a grande variabilidade dos resultados, a baixa reprodutibilidade, proporcionalmente ao aumento da turbidez (Francy et al., 2004) da água, além de custos elevados em comparação com os métodos utilizados para análise de outros parâmetros ou indicadores de qualidade da água (Atherholt et al., 1998).

No Brasil, a inclusão da pesquisa de protozoários patogênicos no monitoramento de amostras ambientais está se iniciando. Embora a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (Brasil, 2011) recomende a avaliação da presença dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água destinada ao consumo humano e ressalte a obrigatoriedade de monitoramento dos mananciais de acordo com a concentração de *Escherichia coli*, vários fatores dificultam o atendimento em curto prazo desta recomendação. Entre eles se destacam a complexidade inerente aos métodos de detecção, a carência de recursos humanos qualificados para o trabalho e a escassez de informações disponíveis sobre a ocorrência desses agentes patogênicos nos recursos hídricos nacionais. No Brasil, surtos causados por protozoários (como *Cyclospora cayetanensis* e *Toxoplasma gondii*) por meio da veiculação hídrica aconteceram na Região Sul, porém, embora as pesquisas científicas sobre estes patógenos estejam em expansão, elas ainda são incipientes, o que gera uma ausência de dados devidamente documentados e comprovados sobre essas ocorrências (Franco, 2007).

Dada a recente revisão da Portaria nº 518/2004 (Brasil, 2004), substituída pela Portaria nº 2.914 (Brasil, 2011), publicada em 14 de dezembro de 2011, o propósito desta revisão é apresentar uma análise crítica sobre as principais metodologias de concentração e detecção dos protozoários intestinais *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de água.

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS PROTOZOÁRIOS *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. RELEVANTES PARA A ÁREA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

Atualmente, o protozoário *Cryptosporidium* é considerado um dos principais contaminantes biológicos da água (Rose et al., 2002). *Giardia* spp. é, por sua vez, um dos patógenos relatados com maior frequência em águas de recreação, além das águas destinadas ao consumo humano (Craun et al., 2005; Schuster et al., 2005). Desde o primeiro surto de criptosporidiose ocorrido em 1984, quando

2.006 casos de gastroenterite foram relatados na cidade de San Antonio, no Texas (D'Antonio et al., 1985), oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. são continuamente detectados em águas superficiais em todo o mundo. Segundo Graczyk & Fried (2007), as concentrações de oocistos variaram de 0,003 a 5.800 oocistos/litro. No Brasil, a prevalência de oocistos nos mananciais variou de 0% a 100 % das amostras analisadas e foram registradas concentrações de até 510 oocistos/litro (Franco, 2011).

Uma das principais características biológicas dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* é a acentuada resistência dos oocistos e cistos à desinfecção por cloro, cloramina e outros desinfetantes químicos empregados nos processos de tratamento da água (Quintero-Betancourt & Rose, 2004). As alternativas de desinfecção com ozônio e luz ultravioleta (UV) mostraram bons resultados na inativação destas formas infectantes (Craik et al., 2001; Hijnen et al., 2006), porém sua eficácia depende da turbidez da água e do tempo de exposição e contato com os cistos e oocistos. Em experimentos controlados, em que se usou água artificial, temperatura ao redor de 25°C, concentração de O₃ acima de 3,0 mg/L e tempo de contato maior que sete minutos, significativa inativação foi alcançada. Entretanto, com o aumento da turbidez da água, registrou-se diminuição das taxas de inativação (Ran et al., 2010). Quanto à desinfecção com luz ultravioleta, para atingir inativação de 3 log (99,9 %) pode ser requerida fluência de 20 mJ/cm² (Hijnen et al., 2006).

Os oocistos exibem potencial infectante mesmo após o contato com agentes floculadores utilizados no tratamento convencional da água (Rose, 1997; Keegan et al., 2008) e apresentam elevada resistência às condições adversas ambientais. Por exemplo, em águas superficiais de rios, permanecem infectantes por até seis meses em temperatura entre 0° e 20°C e resistem à salinidade de 35% por 40 dias a 18°C (Fayer et al., 2000).

A dimensão aproximada dos oocistos e cistos é de 3,0 a 8,5 micrometros e 8 a 15 micrometros, respectivamente. Embora possuam características similares de sedimentação e filtração, a remoção de oocistos de *Cryptosporidium* por filtração é algo inferior à dos cistos de *Giardia* (Heller et al., 2004). Assim, durante o processo de tratamento de água, a remoção de protozoários depende basicamente da etapa física. Estações de Tratamento de Água que utilizam o processo convencional de tratamento (baseado em floculação, coagulação, sedimentação e filtração) atingem, em geral, uma remoção de 99% dos oocistos de *Cryptosporidium* nas etapas de decantação e filtração, diminuindo, assim, o risco de transmissão (Bustamante et al., 2001; Dai & Hozalski, 2002). Entretanto, durante a filtração, a compressibilidade exibida pelos oocistos de *Cryptosporidium* permite que essas formas de resistência passem a se comportar como uma partícula de 2 a 4 micrometros (Hsu & Yeh, 2003; Carey et al., 2004). Desse modo, um pequeno número de oocistos pode chegar à água tratada e, por essa via, propagar-se aos consumidores.

A ingestão de poucos cistos e oocistos pode causar infecção. Experimentos com voluntários humanos demonstraram que a dose infectante é de 9 a 1.042 oocistos, dependendo da cepa de *Cryptosporidium*; para *Giardia*, a ingestão de 10 a 25 cistos já é suficiente para causar doença (Okhuysen & Chappell, 2002; Rendtorff, 1954).

Outro agravante é o grande potencial para a contaminação ambiental, pois um único bezerro infectado pode eliminar 1 bilhão a 10 bilhões de oocistos nas fezes durante uma semana (Fayer et al., 2004). A eliminação de cistos nas fezes de um hospedeiro infectado pode atingir 10^7 cistos/g/fezes (Smith & Grimason, 2003).

Embora a taxonomia de ambos os protozoários ainda seja controversa, tanto *Giardia* quanto *Cryptosporidium* apresentam potencial zoonótico. Das 20 espécies de *Cryptosporidium* hoje aceitas, pelo menos 8 são infectantes para o ser humano (Tabela 1) e os subgenótipos A1 e B3 de *Giardia duodenalis* podem infectar o ser humano e animais (Tabela 2) (Monis et al., 2009). Entretanto, a frequência e a relevância da transmissão zoonótica, antroponótica ou zooantroponótica são aspectos ainda a serem elucidados.

Tabela 1. Espécies de *Cryptosporidium* aceitas e infectividade para o ser humano

Espécie	Hospedeiro Principal	Infeccioso para o ser humano	Tamanho dos Oocistos (μm)	Referência
1. <i>C. hominis</i>	Homem	Sim	4,5 x 5,4	Morgan-Ryan et al., 2002
2. <i>C. parvum</i>	Ruminantes	Sim	4,5 x 5,5	Tyzzler, 1912
3. <i>C. andersoni</i>	Bovinos	Sim	5,5 x 7,4	Lindsay et al., 2000
4. <i>C. muris</i>	Roedores	Sim	5,6 x 7,4	Tyzzler, 1907
5. <i>C. suis</i>	Suínos	Sim	4,4 x 4,9	Ryan et al., 2004
6. <i>C. felis</i>	Felinos	Sim	4,5 x 5,0	Iseki, 1979
7. <i>C. canis</i>	Canídeos	Sim	3,68 x 5,88	Fayer et al., 2001; Pedraza-Díaz et al., 2001.
8. <i>C. bovis</i>	Bovinos	--	4,63 x 4,89	Fayer et al., 2005
9. <i>C. ryanae</i>	Bovinos	--	3,16 x 3,73	Fayer et al., 2008
10. <i>C. xiaoi</i>	Ovelhas	--	2,94 x 3,44	Fayer & Santin, 2009
11. <i>C. wairi</i>	Cobaios	--	4,0 x 4,8	Vetterling et al., 1971
12. <i>C. baileyi</i>	Aves	Sim	5,2 x 6,3	Current et al., 1986
13. <i>C. meleagridis</i>	Aves	Sim	4,5 x 4,6	Slavin, 1955
14. <i>C. galli</i>	Aves	--	6,2 x 8,5	Ryan et al., 2003
15. <i>C. serpentis</i>	Répteis	--	4,8 x 5,6	Levine, 1980
16. <i>C. fayeri</i>	Cangurus	--	4,3 x 4,9	Ryan et al., 2008
17. <i>C. macropodum</i>	Cangurus	--	4,9 x 5,1	Power & Ryan, 2008
18. <i>C. varanii</i>	Lagartos	--	4,7 x 4,8	Pavlascek & Ryan, 2008
19. <i>C. ubiquitum</i>	Cervos	Sim	5,04 x 4,66	Fayer et al., 2010
20. <i>C. cuniculus</i>	Coelhos	Sim	5,98 x 5,38	Robinson et al., 2010.

Nota: As espécies de *Cryptosporidium* que infectam peixes (*C. cichlidis* e *C. reichenbachlinket*) não foram incluídas na tabela pela posição taxonômica incerta e por terem sido inicialmente descritas como pertencentes ao gênero *Piscicryptosporidium* (Jirku et al., 2008; Ryan, 2010).

Tabela 2. Espécies e genótipos do gênero *Giardia*

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

Fonte: Modificado de Monis et al. (2009) e Plutzer et al. (2010).

MÉTODOS DE DETECÇÃO DOS PROTOZOÁRIOS *Cryptosporidium* spp. E *Giardia* spp. EM ÁGUAS

Os métodos de detecção de oocistos e cistos em amostras de água são fundamentados em três etapas: a coleta e a concentração da amostra, seguidas de etapa de purificação e, finalmente, a visualização e enumeração dos protozoários (Anonymous, 1999; Aldom & Chagla, 1995; EPA, 1999; EPA, 2005; Vesey et al., 1993). Inicialmente, as diferentes metodologias foram delineadas para o monitoramento da ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas superficiais brutas e em água tratada distribuída à população. Entretanto, com a crescente importância do conhecimento sobre a veiculação hídrica dos oocistos de *Toxoplasma gondii* e de *Cyclospora cayetanensis*, modificações vêm sendo introduzidas com o objetivo de contemplar a detecção ambiental destes protozoários (Sturbaum et al., 1998; Quintero-Betancourt et al., 2002; Villena et al., 2004; Dumetre & Dardé, 2005).

Os procedimentos iniciais para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* incluíam a filtração de grande volume de água (cerca de 100 L para água bruta e 1.000 L para água tratada), obtenção de concentrados mediante a filtração em cartuchos do tipo *cartridge* (filtros de polipropileno com 1 μm de porosidade nominal), seguindo-se sucessivas lavagens do filtro com soluções contendo surfactante (Tween 80 - 0,01%) para desprender os oocistos capturados da matriz de filtração. Em seguida, o líquido de eluição resultante era centrifugo-concentrado a 1.100 – 1.500 x g, com a finalidade de obter um *pellet* \leq 5 ml, o qual era purificado mediante gradiente de Percoll®- sacarose, com gravidade específica de 1,1. Após a retirada dos

resíduos da suspensão de purificação, a detecção dos oocistos era realizada com o emprego de anticorpos monoclonais em reação de imunofluorescência indireta, em pequenas membranas (de 0,22µm de porosidade nominal e diâmetro de 25 mm), clarificadas antes do exame microscópico com solução seriada contendo etanol e glicerol (EPA, 1995).

Os resultados eram relatados por volumes de 100 litros e a performance e sensibilidade do método dependia da presença ou concentração de determinados fatores interferentes tais como turbidez, presença de microalgas, argila, polímeros e coagulantes usados nos processos de tratamento, como resíduos de ferro e alumínio (EPA, 1995). Em um estudo, a eficiência de recuperação do método foi de 28,4±11,0% para cistos de *Giardia* e 9,3±3,3% para oocistos de *Cryptosporidium*, quando analisadas amostras de 40 litros de água bruta; para água tratada, o desempenho do ICR foi de 30,0 ±11,7% para cistos e 9,8±4,5% para oocistos (Hsu et al., 2001).

A precipitação química ou floculação em carbonato de cálcio foi desenvolvida por Vesey et al. (1993) para concentrar *Cryptosporidium* em amostras com volume de 10 litros de água. Neste procedimento, a amostra de água é submetida à agitação rápida com a adição de 100 ml das soluções de cloreto de cálcio (1M) e bicarbonato de sódio (1M). A seguir, o pH é elevado (10) com solução de hidróxido de sódio (1M). Após um período de sedimentação (*overnight*), o sobrenadante é descartado e o precipitado formado é dissolvido empregando-se 200mL da solução de ácido sulfâmico a 10% e, posteriormente, concentrado por sucessivas centrifugações (3.000 x g; 10 min) até a obtenção de um *pellet* que é aliqotado e examinado por microscopia de fluorescência.

Uma das limitações apresentadas por essa metodologia é a possibilidade de ocorrência de resultados falso-positivos ou negativos, já que a precipitação química acontece em pH elevado e período prolongado (*overnight*) e a dissolução do sedimento com o emprego de ácido sulfâmico pode produzir deformações nos cistos e oocistos, o que acarreta maior dificuldade no reconhecimento dos parasitos no exame em microscópio. Além disso, a manipulação de reagentes ácidos e de bases fortes requer maior cuidado laboratorial e procedimentos de biossegurança.

O emprego de outros agentes floculantes e/ou ácidos para dissolução do precipitado acarreta redução da fluorescência dos cistos e oocistos ou aumento da fluorescência residual. Este método também não se aplica às amostras com baixa turbidez (menos que 1 UT), como a água tratada. Entretanto, a floculação com sulfato de alumínio ou sulfato férrico é uma metodologia bastante utilizada para a detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em amostras de água. Experimentos com inóculo variando entre 10⁴ e 10⁵ oocistos esporulados resultaram em elevada eficiência de recuperação: 41,5% (±9,0) a 96,5% (± 21,7) e 35,9% (±12,3) a 93,1% (±8,1) para as soluções de sulfato de alumínio e sulfato férrico, respectivamente (Kourenti et al., 2003).

Outra limitação do método de floculação com carbonato de cálcio consiste na necessidade de se trabalhar com um pH mais elevado para efetuar a reação de precipitação química. Esta situação compromete os ensaios de infectividade e constitui uma restrição em situações de investigação de surtos.

Outro método alternativo proposto para a detecção de oocistos e cistos em amostras hídricas é a técnica de filtração em membranas (Aldom & Chagla, 1995; Dawson et al., 1993; Ongerth & Stibbs, 1987). A amostra de água é filtrada utilizando-se bomba de vácuo (fluxo de 4 L/min.) e sistema porta-filtro; após a filtração, o material é eluído a partir da superfície da membrana mediante extração mecânica com solução de Tween 80 a 0,01%. O material resultante é concentrado por dupla centrifugação (1.050 x g; 10 min.). Há variações desta metodologia nas quais se empregam membranas de diferentes tamanhos: 293 mm (Ongerth & Stibbs, 1987), 142 mm (Dawson et al., 1993) e 47 mm (Franco et al., 2001). A eluição dos organismos capturados na membrana filtrante pode ser realizada mediante lavagem e raspagem da superfície da membrana (Franco et al., 2001) ou por sua dissolução em acetona (Graczyk et al., 1997). Segundo Carreno et al. (2001), a infectividade é diminuída a cada etapa do procedimento quando é empregada a dissolução em acetona. A eficiência de recuperação média para oocistos relatada na literatura varia de 25,5% a 70,5% (Dawson et al., 1993; Aldom & Chagla, 1995). No Brasil, essa metodologia tem sido empregada em diversos estudos que tratam da ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras ambientais diversas, tais como água bruta superficial (Franco et al., 2001; Muller, 1999), esgoto e córregos (Farias et al., 2002), efluentes de esgoto (Cantusio Neto et al., 2006), água mineral em galões de 20 litros (Franco & Cantusio Neto, 2002), bem como em estudos moleculares (Araújo et al., 2011).

A maior limitação da técnica de filtração em membranas é o efeito da turbidez da água, pois quanto maior é a turbidez mais rapidamente ocorre a obstrução dos poros da membrana, o que gera a necessidade de trocar as membranas para filtrar todo o volume estipulado para a amostra.

Cantusio Neto et al. (2010) avaliaram comparativamente as metodologias de floculação em carbonato de cálcio de Vesey et al. (1993) e filtração em membranas de 47 mm de diâmetro (Franco et al., 2001), aplicando ou não a purificação por separação imunomagnética. Nos ensaios com água reagente utilizando EasySeed®, a filtração em membranas acarretou maior recuperação de organismos, mas, quando foi utilizado ColorSeed® como controle interno e inoculado artificialmente em amostras de água bruta, houve um pequeno decréscimo na eficiência de recuperação de cistos e oocistos. Os autores concluíram que características da amostra de água, tais como, sílica, presença de ácidos húmicos, bactérias, algas, metais, matéria orgânica em decomposição, bem como variações do pH e da turbidez, são fatores críticos que podem acarretar grande variabilidade de recuperação, afetando negativamente a sensibilidade das diversas metodologias.

Na década de 1990, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, reconhecendo a necessidade de otimização dos métodos de detecção de *Cryptosporidium* em água, realizou um censo das metodologias utilizadas para o monitoramento da ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* naqueles pais com a finalidade de identificar novas tecnologias. Posteriormente, houve um esforço para a padronização, otimização e validação dos diferentes procedimentos, o que resultou no Método 1622 (EPA-821-R-99-001).

O Método 1622 representou um avanço em relação às metodologias já existentes por incluir uma etapa de purificação que emprega a separação imunomagnética (IMS) ao invés dos procedimentos convencionais de purificação. A separação imunomagnética concentra os oocistos por meio de microesferas magnetizadas recobertas com anticorpo monoclonal anti-*Cryptosporidium*.

Após a filtração das amostras de água em cápsulas de filtração (Envirocheck® ou Sistema Filta-Max®), procede-se à eluição com soluções de tamponamento e o *pellet* resultante é incubado sob rotação constante durante 60 minutos, com as microesferas magnéticas, que, por meio dos anticorpos de captura, ligam-se aos oocistos. A suspensão contendo parasitos e microesferas é inserida em um ímã (concentrador magnético de partículas) que promove a adesão dos complexos de microesferas magnetizadas com anticorpos de captura de oocistos na parede do tubo de Leighton onde ocorre a reação. Após o descarte do líquido, os complexos são liberados do ímã. A seguir, os oocistos são dissociados das microesferas usando-se uma lavagem com ácido (dissociação ácida) ou por aquecimento a 80°C (dissociação térmica). Os oocistos presentes no líquido resultante da dissociação são transferidos para o poço da lâmina de imunofluorescência, após serem neutralizados com uma solução básica. A seguir, as lâminas são incubadas com anticorpos direcionados contra os epítomos da parede dos oocistos, conjugados com fluorocromo isotiocianato de fluoresceína e simultaneamente à reação de imunofluorescência direta é realizada a coloração com o corante vital DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindol) para a realização do teste confirmatório da morfologia. Durante a microscopia, as formas que fluorescem na tonalidade verde-maçã brilhante têm sua morfologia confirmada mediante a coloração com DAPI. O número de oocistos presentes na amostra é estimado com base no número de formas visualizadas no poço da lâmina, exibindo a impregnação do corante fluorogênico vital em tons de azul-claro (já que o DAPI tem afinidade por DNA nuclear).

Como o Método 1622 era direcionado apenas à detecção dos oocistos de *Cryptosporidium*, foi logo substituído pelo Método 1623, que permanece como método de referência e também contempla os cistos de *Giardia*.

Outras modificações introduzidas pelo Método 1623 foram o menor volume de amostra (10 L) e a filtração por meio de cápsulas contendo filtros de polisulfona. Após a filtração, a cápsula é preenchida com solução de eluição e submetida à agitação em *shaker* durante cinco minutos, sendo recolhido o líquido resultante. Essa etapa é repetida novamente e o eluato final é concentrado por

centrifugação a 1.050 x g, sendo o volume final reconstituído a 10 mL para o procedimento de separação imunomagnética. A Tabela 3 apresenta a comparação entre o procedimento clássico (*ICR Method*) e o Método 1623.

Tabela 3. Comparação entre as etapas analíticas do procedimento clássico (*ICR Method*) e o método de referência (Método 1623 – USEPA) para o monitoramento de oocistos e cistos em amostras de água

Etapa analítica	ICR Method	Método 1623
Volume da Amostra:		
- água bruta	- 100 litros	- 10 litros
- água tratada	- Até 1000 litros	- Até 1.000 litros
Tipo de Filtro:	- Cartucho (<i>cartdrige</i>); porosidade nominal	- Cápsulas de filtração; porosidade absoluta de 1,2 µm
Purificação:	- Flutuação em solução de Percoll-sacarose (gradiente de densidade)	- Separação Imunomagnética
Visualização:	Reação Indireta de imunofluorescência, processada em membranas de 25 mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade nominal; microscopia de contraste de fase.	- Reação direta de imunofluorescência; teste confirmatório da morfologia com DAPI* e microscopia de interferência diferencial.

Fonte: Modificado de Connel et al., 2000. *DAPI = 4',6',diamidino-2-fenilindol

O Método 1623 foi delineado para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em amostras de água superficial bruta e água tratada, porém seu desempenho é afetado pelo aumento da turbidez da água (Di Giorgio et al., 2002), pelo teor de ferro dissolvido presente na amostra de água (Yakub & Stadterman-Knauer, 2000) e por variações do pH (Kuhn et al., 2002) ou do tempo de rotação durante a incubação das microesferas e a amostra (Hu et al., 2004). A escolha do protocolo de dissociação também é um fator crítico. De acordo com Ware et al. (2003), a dissociação térmica que inclui a incubação a 80°C, durante dez minutos, acarretou significativo aumento da recuperação de oocistos (de 41% para 71% em água reagente e de 10% para 51% em amostras de água de rio artificialmente contaminadas).

A concentração da amostra durante a filtração resulta no acúmulo de partículas de tamanho similar aos oocistos. Esta presença de sujidades na amostra concentrada é um dos principais fatores que limitam a eficiência de recuperação das metodologias, a despeito do método empregado (quer sejam os procedimentos alternativos, como a filtração em membranas e a floculação em carbonato de cálcio, quer seja o Método 1623). De acordo com Smith & Nichols (2010), há uma grande probabilidade de que os oocistos fiquem encobertos nestas sujidades, cerca de 10⁸:1 em 10 litros de água bruta.

Consideradas em conjunto, as diferentes metodologias de concentração e detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas apresentam diversas limitações que são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Limitações dos métodos de detecção de protozoários patogênicos em amostras de água

Características inerentes
<ul style="list-style-type: none">• Custo elevado; necessidade de insumos importados.• Grande variabilidade dos resultados gerados.• Baixa eficiência de recuperação, em geral variando de 1% a 50% mesmo com metodologia sofisticada, como o Método 1623.• Turbidez e composição físico-química da amostra influenciam na obtenção dos resultados.• Não identificam espécie.• Não fornecem informações sobre infectividade dos organismos detectados.• Requerem recursos humanos especializados.

CONTROLE DE QUALIDADE E DESEMPENHO DAS METODOLOGIAS

O Método 1623 (USEPA, 2005) possui uma seção de Controle de Qualidade que visa reduzir os possíveis erros e promover dados confiáveis na análise de protozoários de veiculação hídrica. Nesse contexto, a análise mínima requerida no procedimento consiste em:

1. demonstrar a capacidade inicial do laboratório de realizar a análise mediante o teste de precisão inicial e recuperação (IPR), com o processamento de quatro alíquotas de 10L de água reagente, contaminadas com suspensão comercial de oocistos (Easy-Seed®), determinando-se a recuperação média (e desvio padrão) alcançada pelo laboratório e fazendo-se a comparação com os critérios de desempenho estipulados pela USEPA;
2. testar o efeito da matriz de água, ensaio este realizado simultaneamente com a análise da amostra de campo mediante o uso de suspensões comerciais de oocistos purificados, irradiados e marcados com um fluorocromo diferente do isotiocianato de fluoresceína (FITC), que é conjugado ao anticorpo monoclonal dos *kits* comerciais usados para a visualização dos protozoários. O fluorocromo sulforodamina, cujo nome comercial é Texas Red®, tem sido empregado com maior frequência para marcar os oocistos a serem utilizados nos ensaios de efeito da matriz. Ou seja, uma vez processada a amostra de água, os protozoários naturalmente presentes e aqueles semeados (controle positivo interno – Color Seed®) são quantificados de forma distinta utilizando-se filtros específicos para cada fluorocromo (FITC: excitação: 495 nm; emissão: 521 nm; Texas Red: excitação: 580 nm; emissão: 615 nm) (Figura 2). Com esse procedimento, determina-se a interferência que as características físico-químicas e microbiológicas da amostra de água analisada ocasionam na eficiência de recuperação. Os valores obtidos devem satisfazer os critérios de aceitação estabelecidos no Método 1623, conforme Cantusio Neto et al. (2011);
3. atestar a precisão na rotina do laboratório mediante a inoculação em diferentes matrizes de água (controles positivos), controle negativo (para assegurar ausência de contaminação) e controle de coloração.

Recentemente, Franco et al. (2012) avaliaram três diferentes protocolos de concentração de cistos e oocistos em amostras de água bruta objetivando avaliar sua performance e aplicabilidade em dois rios brasileiros, a saber: a) precipitação química (FCC); b) filtração em membranas de 47mm de diâmetro e 3µm de porosidade nominal (FM); c) filtração com o sistema Filta-Max® (FM-M). A precisão inicial e a recuperação de organismos (IPR) foram determinadas utilizando-se 10 L de água reagente semeada com Easy-Seed® e amostras de água bruta dos estados de São Paulo e Minas Gerais foram analisadas após a contaminação artificial com Color-Seed®. Os resultados de precisão inicial das diferentes metodologias e a recuperação de organismos marcados (Color-Seed®) foram comparados com os critérios de aceitação estabelecidos pelo Método 1623 da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Embora o Método FM-M tenha sido o único que satisfizesse todos os critérios de performance para identificação de *Cryptosporidium* e *Giardia* em água, observou-se uma grande dificuldade de obtenção de resultados quando foi empregada a metodologia Filta-Max para análise de uma amostra complexa, rica em ferro, matéria orgânica e com a presença de óleos, graxas e grande quantidade de material em suspensão (possivelmente algas).

Portanto, a escolha do método a ser empregado deve levar em consideração o propósito da análise, o tipo de amostra de água e sua qualidade físico-química e microbiológica, bem como a prática do laboratório em executar a análise parasitológica da água, além dos custos.

A contaminação dos recursos hídricos por protozoários patogênicos de veiculação hídrica ocorre em todo o mundo e representa um desafio para os sistemas produtores e distribuidores de água. Para o cumprimento da Portaria nº 2.914, é necessária a devida estruturação laboratorial no país, assim como a capacitação de recursos humanos.

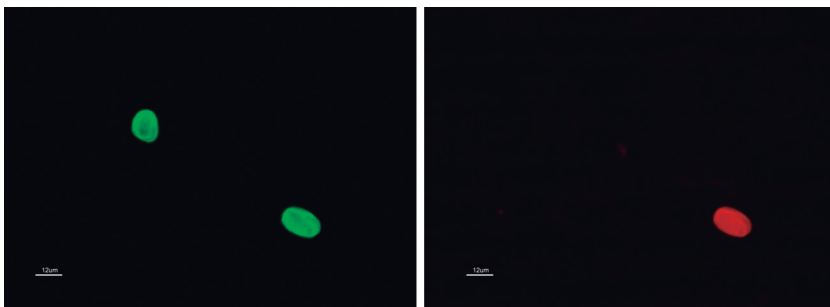


Figura 2. Cistos de *Giardia* sp. em uma amostra ambiental, marcados com anticorpo monoclonal conjugado com isotiocianato de fluoresceína (cor verde-maçã) e com o corante Texas Red (Color-Seed®) (cor vermelha).

REFERÊNCIAS

1. Aldom JE, Chagla AM. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. *Letters Appl Microbiol* 20: 186-187, 1995.
2. Anonymous. Standard operating protocol for the monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in treated water supplies to satisfy water supply (water quality) (amendment) regulations. SI Nº1524, 1999.
3. Araújo RS, Dropa M, Fernandes LN, Carvalho TT, Sato MIZ, Soares RM, Matté GR, Matté MH. Genotypic characterization of *Cryptosporidium hominis* from water samples in São Paulo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 85: 834-838, 2011.
4. Atherholt TB, LeChevallier MW, Norton WD, Rosen JS. Effect of rainfall on *Giardia* and *Crypto*. *J Am Water Works Assoc* 90: 66-80, 1998.
5. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Wat Res* 45: 6603-6614, 2011.
6. Branco SM. Água, Meio Ambiente e Saúde. In: Rebouças AC, Braga B, Tundisi JG. *Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação*. Escrituras, São Paulo, 2002.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 24 de Março de 2004. Padrão de potabilidade da água para consumo humano. Brasília, 2004.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de Dezembro de 2011. Publicada no D.O.U. Nº 239, Seção 1, página 39 de 14/12/2011. Brasília, 2011.
9. Bustamante HA, Shanker SR, Pashley RM, Karaman ME. Interaction between *Cryptosporidium* oocysts and water treatment coagulants. *Wat Res* 35: 3179-3189, 2001.
10. Cantusio Neto R, Santos LU, Franco, RMB. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts by a UV at sludge treatment plant in Campinas, Southeast of Brazil. *Wat Sci Tech* 54: 89-94, 2006.
11. Cantusio Neto R, Santos LU, Sato MIZ, Franco RMB. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, Southeast Brazil. *Wat Sci Tech* 62: 217-222, 2010.
12. Cantusio Neto R, Santos LU, Sato MIZ, Franco RMB. Controle de qualidade analítica dos métodos utilizados para a detecção de protozoários patogênicos em amostras de água. *Arq Inst Biol São Paulo* 78: 169-178, 2011.
13. Carreno RA, Pokorny NJ, Weir SC, Lee H, Trevors JT. Decrease in *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in vitro by using membrane filter dissolution method for recovering oocyst from water samples. *Appl Environ Microbiol* 67: 3309-3313, 2001.
14. Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Wat Res* 38: 818-862, 2004.
15. Craik SA, Weldon D, Finch GR, Bolton JR, Belosevic M. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium and low pressure ultraviolet radiation. *Wat Res* 35: 1387-1398, 2001.
16. Connel K, Rodgers CC, Shank-Givens HL, Scheller J, Pope ML, Miller K. Building a better protozoa data set. *J Am Water Works Assoc* 92: 30-43, 2000.
17. Craun GF, Hubbs SA, Frost F, Calderon RL, Via SH. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *J Am Water Works Assoc* 90: 81-91, 1998.
18. Current WL, Upton SJ, Haynes TB. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n.sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J Protozool* 33: 289-296, 1986.
19. Craun GF, Calderon RL, Craun MF. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int J Environ Health Res* 15: 243-262, 2005.
20. D'Antonio RG, Winn MD, Taylor J, Gustafson TL, Current WL, Rhodes MM, Gary GW, Zajac RA. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Ann Inter Med* 103: 886-888, 1985.
21. Dai X, Hozalski RM. Evaluation of microspheres as surrogates for *Cryptosporidium parvum* oocysts in filtrations experiments. *Environ Sci Technol* 37: 1037-1042, 2003.
22. Dawson DJ, Maddocks M, Roberts J, Vidler JS. Evaluation of recovery of *Cryptosporidium parvum* oocysts using membrane filtration. *Letters Appl Microbiol* 17: 276-279, 1993.
23. Di Giorgio CL, Gonzalez DA, Huitt CC. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using EPA method 1623. *Appl Environ Microbiol* 68: 5952-5955, 2002.

24. Dumètre A, Dardé ML. Immunomagnetic separation of *Toxoplasma gondii* oocysts using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall. *J Microbiol Meth* 61: 209-217, 2005.
25. EPA - Environmental Protection Agency. ICR method. Detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by a fluorescent antibody procedure. US Environmental Protection Agency. Office of ground water and drinking water. EPA/ 814-B-95-003, 1995.
26. EPA - Environmental Protection Agency. Office of Water. Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA. EPA 821-R-99-001. US Environmental Protection Agency. Washington DC, EEUU, 1999.
27. EPA - Environmental Protection Agency. Office of Water. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. EPA 815-R-05-002. US Environmental Protection Agency. Washington DC, EEUU, 2005.
28. Erlandsen SL, Bemrick WJ. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *J Parasitol* 73: 623-629, 1987.
29. Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudson L, Campbell SR, van Keulen H, Jarroll EL. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue Heron (*Ardea herodias*). *J Parasitol* 76: 717-724, 1990.
30. Ey PL, Mansouri M, Kulda J, Nohynkova E, Monis PT, Andrew RH, Mayrhofer G. Genetic analysis of *Giardia* from hooved farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukaryot Microbiol* 44: 626-635, 1997.
31. Farias EWC, Gamba RC, Pellizari VH. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol* 33: 41-43, 2002.
32. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 30: 1305-1322, 2000.
33. Fayer R, Trout Jm, Xiao L, Morgan UM, Lai AA, Dubey JP. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J Parasitol* 87:1415-1422, 2001.
34. Fayer R, Dubey JP, Lindsay DS. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol* 20: 531-536, 2004.
35. Fayer R, Santín M, Xiao L. *Cryptosporidium bovis* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol* 91: 624-629, 2005.
36. Fayer R, Santín M, Trout JM. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol* 156: 191-198, 2008.
37. Fayer R, Santín M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet Parasitol* 164: 192-200, 2009.
38. Fayer R, Santín M, Macarisin D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet Parasitol* 172: 23-32, 2010.
39. Feely DE. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. *J Protozool* 35: 52-54, 1988.
40. Franco RMB, Rocha-Eberhardt R, Cantusio Neto R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 43: 109-111, 2001.
41. Franco RMB, Cantusio Neto R. Occurrence of cryptosporidial oocysts and *Giardia* cysts in bottle mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 205-207, 2002.
42. Franco RMB. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em Saúde Pública. *Rev Pan Infectol* 9: 36-43, 2007.
43. Franco RMB. *Sarcocystis*, *Cystoisospora* e *Cryptosporidium*. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia Médica*. 12ª Ed. Atheneu: São Paulo, 2011. p.189-198.
44. Franco RMB, Hachich EM, Sato MIZ, Naveira RML, Silva EC, Campos MMC, Cantusio Neto R, Cerqueira DA, Branco N, Guiguet Leal DA. Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água destinada ao consumo humano, para o atendimento às demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*, 2012 (no prelo).

45. Francys DS, Simmons III OD, Ware MW, Granger EJ, Sobsey MD, Schaefer III FW. Effects of seeding procedures and water quality on recovery of *Cryptosporidium* oocysts from stream water by using U.S. Environmental Protection Agency Method 1623. *Appl Environ Microbiol* 70: 4118-4128, 2004.
46. Gale P, Stanfield G. *Cryptosporidium* during a simulated outbreak. *J Am Water Works Assoc* 92: 105-116, 2000.
47. Graczyk TK, Fayer R, Cranfield MR, Owens R. *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from water by the membrane filtration method retain their infectivity. *J Parasitol* 83: 111-114, 1997.
48. Graczyk TK, Fried B. Human waterborne trematode and protozoan infections. *Adv Parasitol* 64: 111-160, 2007.
49. Grassi B. Dei protozoi parassiti e specilmente di quelli che sono nell'uomo. *Gazz. Med. Ital. Lomb.* 39: 445-448, 1879.
50. Heller L, Bastos RXX, Vieira MBCM, Bevilacqua PD, De Brito LLA, Mota SMM, Oliveira AA, Machado PM, Salvador DP, Cardoso AB. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. *Epidemiol Serv Saúde* 13: 79-92, 2004.
51. Hijnen WAM, Beerendonk EF, Medema GJ. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Wat Res* 40: 3-22, 2006.
52. Homan WL, van Enckevort FH, Limper L, van Eys GJ, Schoone GJ, Kasprzak W, Majewska AC, van Knipen F. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol Res* 78: 316-323, 1992.
53. Hu J, Feng Y, Ong SL, Ng WJ, Song L, Tan X, Chu X. Improvement of recoveries for the determination of Protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* in water using method 1623. *J Microbiol Meth* 58: 321-325, 2004.
54. Hsu BM, Huang C, Hsu YF, Jiang GY, Hsu CLL. Evaluation of two concentrations methods for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. *Wat Res* 35: 419-424, 2001.
55. Hsu BM, Yeh HH. Removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water treatment: a pilot-scale study. *Wat Res* 37: 1111-1117, 2003.
56. Iseki M. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *Jpn J Parasitol* 28: 285-307, 1979.
57. Jirku M, Valigurova A, Koudela B, Krizek J, Modry D, Slapeta J. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol* 55:81-94, 2008.
58. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Wat Health* 5: 1-38, 2007.
59. Keegan A, Daminato D, Sant CP, Monis PT. Effect of water treatment processes on *Cryptosporidium* infectivity. *Wat Res* 42: 1805-1811, 2008.
60. Kourenti C, Heckerth A, Tenter A, Karanis P. Development and application of different methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in water. *Appl Environ Microbiol* 69: 102-106, 2003.
61. Kuhn RC, Rock CM, Oshima KH. Effects of pH and magnetic material on immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from concentrated water. *Appl Environ Microbiol* 68: 2066-2070, 2002.
62. Kunstler J. Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. *CRS Soc Biol Paris* 95:347-349, 1882.
63. Levine ND. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J Parasitol* 66: 830-834, 1980.
64. Lindsay DS, Upton SJ, Owens DS, Morgan UM, Mead JR, Blagburn BL. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol* 47: 91-95, 2000.
65. Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitol* 111: 11-17, 1995.
66. Meloni BP, Thompson RCA. Comparative studies on the axenic in vitro cultivation of *Giardia* of human and canine origin: evidence for intraspecific variation. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 637-640, 1987.

67. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Isaac- Renton JL, Ey PL. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organism isolated from dogs in Australia. *Parasitol* 116: 17-19, 1998.
68. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol* 16: 1135-1144, 1999.
69. Monis PT, Cacció SM, Thompson RCA. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* 25: 93-100, 2009.
70. Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman I, Fayer R, Thompson RCA, Olson M, Lal A, Xiao L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa:Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J Eukaryot Microbiol* 49: 433-440, 2002.
71. Muller APB. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo. Brasil. [Dissertação Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo], 1999.
72. Okhuysen PC, Chappell CL. *Cryptosporidium* virulence determinants- are we there yet? *Int J Parasitol* 32: 517-525, 2002.
73. Ongerth JE, Stibbs HH. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Appl Environ Microbiol* 53: 672-676, 1987.
74. Pavlasek I, Ryan U. *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. *Exp Parasitol* 118: 434-437, 2008.
75. Pedraza-Díaz S, Amar C, Iversen AM, Stanley PJ, McLaughlin J. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* “dog type” from patients in England. *J Med Microbiol* 50: 293-296, 2001.
76. Power ML, Ryan UM. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J Parasitol* 94: 1114-1117, 2008.
77. Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: facts and open questions. *Int J Hyg Environ Health* 213: 321-333, 2010.
78. Quintero-Betancourt W, Peele ER, Rose JB. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *J Microbiol Meth* 49: 209-224, 2002.
79. Quintero-Betancourt W, Rose JB. Drinking water treatment process for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet Parasitol* 126: 219-234, 2004.
80. Ran Z, Li S, Huang J, Yuan Y, Cui X, Williams CD. Inactivation of *Cryptosporidium* by ozone and cell ultrastructures. *J Environ Sci* 22: 1954-1959, 2010.
81. Rendtorff RC. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* given in capsules. *Amer J Hyg* 59: 209-220, 1954.
82. Rose JB. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Annu Rev Public Health* 18: 135-161, 1997.
83. Robinson G, Wright S, Elwin K, Hadfield SJ, Katzer F, Bartley PM, Hunter PR, Nath M, Innes EA, Chalmers RM. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman & Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *J Parasitol* 40: 1359-1548, 2010.
84. Rose JB, Huffman DE, Gennaccaro A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiol Rev* 26: 113-123, 2002.
85. Ryan UM, Xiao L, Read C, Sulaiman IM, Monis , Lal AA, Fayer R, Pavlasek I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from birds. *J Parasitol* 89: 809-813, 2003
86. Ryan UM, Monis P, Enemark HL, Sulaiman I, Samarasinghe B, Read C, Buddle R, Robertson I, Zhou L, Thompson RC, Xiao L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J Parasitol* 90: 769-773, 2004.
87. Ryan UM, Power M, Xiao L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the red kangaroo (*Macropus giganteus*). *J Eukaryot Microbiol* 55: 22-26, 2008.
88. Ryan U. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Exp Parasitol* 124: 113-120, 2010.

89. Schuster CJ, Ellis AG, Robertson WJ, Charron DF, Aramini JJ, Marshall BJ, Medeiros DT. Infectious disease outbreaks related to drinking water in Canada, 1974-2001. *Canadian J Pub Health* 96: 254-258, 2005.
90. Slavin D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J Comp Pathol* 65: 262-266, 1955.
91. Smith HV, Nichols RAB. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. *Exp. Parasitol.* 124:61-79, 2010.
92. Smith HV, Grimason AM. *Giardia* and *Cryptosporidium*. In: Mara D, Horan NJ. The handbook of water and wastewater microbiology. Academic Press, 2003. 819 pp.
93. Sturbaum GD, Ortega YR, Gilman RH, Sterling CR, Cabrera L, Klein D. Detection of *Cyclospora cayentanensis* in wastewater. *Appl Env Microbiol* 64: 2284-2286, 1998.
94. Tyzzer EE. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv fur Protistenk* 26: 394-418, 1912.
95. Tyzzer EE. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen et sp nov), of the gastric glands of the common mouse. *J Med Res* 23: 487-511, 1910.
96. Tyzzer EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceed Soc Exp Biol Med* 5:12-13, 1907.
97. Vesey G, Slade JS, Byrne M, Shepherd K, Fricker CR. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *J Appl Bacteriol* 75: 82-86, 1993.
98. Vetterling JM, Takeuchi A, Madden PA. Ultrastructure of *Cryptosporidium wairi* from the guinea pig. *J Protozool* 18: 248-260, 1971.
99. Villena I, Aubert D, Gomes P, Ferté H, Ingland JC, Denis-Bisiaux H, Dondon JM, Pisano E, Ortis N, Pinon JM. Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl Environ Microbiol* 70: 4035-4039, 2004.
100. Yakub GP, Stadterman-Knauer KL. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. *Appl Environ Microbiol* 66: 3628-3631, 2000.
101. Ware MW, Nymer L, Lindquist HAD, Schaeffer FW III. Evaluation of an alternative IMS dissociation procedure for use with method 1622: detection of *Cryptosporidium* in water. *J Microbiol Meth* 55: 575-583, 2003.