

REVISIÓN DE TÉCNICAS PARA DETECTAR *GIARDIA* Y *CRYPTOSPORIDIUM* EN MUESTRAS DE AGUA

SILVANA PERTUZ¹, JENNY DE LA ROTTA²,
ISMENIA ARAUJO¹ Y NAIROBY JIMÉNEZ¹

¹Laboratorio de Microbiología. Centro de Investigación del Agua, Facultad de Ingeniería, La Universidad del Zulia, Ciudad Universitaria, Lagunas de Oxidación, Apartado Postal 98, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. Telefax: (5861) 596206, e-mail: spertuz@solidos.ciens.luz.ve

²Cátedra de Biología Celular, Facultad de Medicina, La Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

RESUMEN.- Esta revisión describe y compara la eficiencia de las técnicas de mayor uso para la detección de *Giardia* y *Cryptosporidium* en muestras de agua y presenta una bibliografía sobre el tema hasta el año 1998. La presencia de estos patógenos en distintos tipos de aguas se ha relacionado a numerosos casos de brotes diarreicos a nivel mundial (especialmente en países desarrollados) razón por lo cual se ha tenido que evaluar su ocurrencia y abundancia. Las técnicas consisten en tres pasos: Concentración, purificación, detección e identificación. El objetivo de esta metodología es la recuperación mediante: 1) Filtración a través de cartuchos de polipropileno para la concentración de los quistes y ooquistes, 2) clarificación por flotación con soluciones de sacarosa sheather o percoll-sacarosa para eliminar partículas presentes en el agua que interfieren con los resultados, y 3) inmunofluorescencia. En la actualidad se están utilizando técnicas con anticuerpos magnetitas para la concentración de los quistes y ooquistes, las sondas y reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección con muy buenos resultados. *Recibido:* 12 Marzo 1998, *aceptado:* 06 Noviembre 1998.

Palabras claves: Técnicas parasitológicas, detección de parásitos, *Giardia*, *Cryptosporidium*, ooquistes, quistes,

aguas blancas, aguas negras, inmunofluorescencia, brotes diarreicos, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), anticuerpos magnetitas.

TECHNIQUES FOR DETECTING *GIARDIA* AND *CRYPTOSPORIDIUM* IN WATER SAMPLES: A REVIEW

ABSTRACT.- This review describes and compares the efficiency of the more common techniques used to detect *Giardia* and *Cryptosporidium* in water samples; as well as provide a bibliography about this subject to the year 1998. The presence of these pathogens in different types of water has been related to numerous diarrhea outbreaks throughout the world (especially in developing countries) making it more important to know the best techniques for detecting their occurrence and abundance. Detection consists of three steps: Concentration, purification, and detection and identification. The objective of this methodology is the recuperation via: 1) Filtration with polypropylene cartridges to concentrate the cysts and oocysts, 2) clarification by flotation with sucrose or sucrose-percoll solutions to eliminate particles present in the water that may interfere with results, and 3) immunofluorescence. Present techniques using antibody-magnetite to concentrate cysts and oocysts, as well as probes and Polymerase Chain Reactions (PCR) to detect *Giardia* and *Cryptosporidium*, give very good results. *Received:* 12 March 1998, *accepted:* 06 November 1998.

Key Words: Parasite detection techniques, *Giardia*, *Cryptosporidium*, oocysts, cysts, surface water, sewage water, immunofluorescence diarrhea outbreaks, Polymerase Chain Reaction (PCR), antibody-magnetite.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha relacionado la presencia de *Giardia* y *Cryptosporidium* con brotes diarreicos transmitidos a través del agua (Benton *et al.* 1989, Craun 1988, Fraser 1994, Fraser 1991, Herwaldt *et al.* 1992, Hibler y Hancock 1990, Lin 1985, Wolfe 1992). Entre 1980 y 1996 investigaciones realizadas en todo el

mundo puntualizan que estos patógenos son agentes causales de más del 50 % de infecciones diarreicas (AWWA 1985, Lin 1985, Akin y Jakubowski 1986, Andersson y Jong 1989, Benton *et al.* 1989, Craun 1988, Hibler y Hancock 1990, Fraser 1991, Herwaldt *et al.* 1992, Fraser 1994). Estos parásitos han sido detectados en todos los ambientes acuáticos superficiales y subterráneos (ríos, lagos, mar, pozos, etc.) (Ongerth 1989, Hibler y Hancock 1990, Rose *et al.* 1991, Johnson *et al.* 1995, LeChevallier y Norton 1995, Ongerth *et al.* 1995, Crabtree *et al.* 1996, Zuckerman *et al.* 1997, Payment *et al.* 1997, Teunis *et al.* 1997, Marshall *et al.* 1997). En aguas de consumo humano se ha verificado la presencia de estos patógenos, los cuales se han asociado a grandes brotes infecciosos (Braidech y Karling 1985, Akin y Jakubowski 1986, Ongerth y Stibbs 1987, Craun 1988, Andersson y Jong 1989, Benton *et al.* 1989, Hass y Rose 1995, LeChevallier *et al.* 1995, Sorbey *et al.* 1995, De Luca *et al.* 1997, States *et al.* 1997, Karanis *et al.* 1998).

En Maracaibo, Venezuela, no hay estudios que reporten la presencia de *Giardia* sp. en agua potable. Sin embargo, la población presenta un alto porcentaje de giardiasis y criptosporidiosis (Chacín-Bonilla *et al.* 1993, Hernández *et al.* 1995, Chango e Iriarte 1996). Para determinar la posible relación entre el hallazgo y la adquisición de las parasitosis, es necesario realizar estudios que confirmen su presencia en esta agua.

Teunis *et al.* (1997) enfatiza sobre la necesidad de tomar en cuenta la presencia de *Giardia* y *Cryptosporidium* en los suministros de agua como problema de salud pública, asumiendo que deben determinarse varios factores tales como: la concentración de quistes o de oocistos en el agua cruda, la remoción de los organismos con los diferentes tratamientos y el consumo de aguas corrientes no hervidas por la población. De esta manera, se puede calcular la tasa de riesgo que tiene una población determinada en contraer la infección, por lo que el establecimiento de un buen sistema de muestreos de agua debe ser el comienzo de un estudio de la calidad de las aguas de suministro.

Los factores que intervienen en la contaminación de las aguas superficiales con oocistos o quistes, están relacionados a un inadecuado tratamiento de las aguas destinadas al consumo humano, a la contaminación de los reservorios de agua con desechos fecales humanos y animales y a las actividades agrícolas relacionadas con el abonado de la tierra con material fecal (Lin 1985, Akin y Jakubowski 1986, Madore *et al.* 1987, Craun 1988, Gassmann y Schwartzbrod 1991, Gilmour *et al.* 1991, Jakubowski *et al.* 1991, Sykora *et al.* 1991, Grimason *et al.* 1993, Bouhoum *et al.* 1997, Ahmab *et al.* 1997, Quintero *et al.* 1998).

Para el control de estas infecciones es necesario la detección de *Giardia* y *Cryptosporidium* en el ambiente. Sin embargo, hasta el momento no se ha podido establecer una técnica que permita encontrar estos patógenos de una manera sensible, económica y sencilla. La técnica estándar, ha propuesto un sistema de recuperación de quistes o de oocistos que parece ofrecer una alternativa, pero, en el caso de países subdesarrollados no es tan viable económicamente (APHA 1992). Para esto se requiere: 1) la concentración de los quistes y oocistos del ambiente, 2) la purificación con el fin de eliminar detritos, y 3) la identificación de dichas estructuras parasitarias (APHA 1992). En los últimos años la detección de *Giardia* y *Cryptosporidium* en el agua ha originado el empleo de varios métodos de biología molecular y de técnicas parasitológicas, las cuales se han modificado hasta lograr la metodología adecuada.

El objetivo de esta revisión es describir brevemente y comparar la eficiencia de las técnicas de mayor uso para la detección de *Giardia* y *Cryptosporidium* en muestras de agua y presentar una bibliografía sobre el tema hasta el año 1998.

TÉCNICAS DE CONCENTRACIÓN

Los ambientalistas y microbiólogos han ideado las técnicas de filtración y recientemente la de concentración con anticuerpos marcados con magnetitas (AWWA 1985, APHA 1992, Rose *et al.*

1992, Bifulco y Schaefer 1993). Diferentes técnicas de filtración han sido utilizadas, basándose en el tipo de material filtrante, membranas de nitrato de celulosa, cartuchos de polipropileno o adoptando principios diferentes como en el caso de la filtración tangencial.

FILTRACIÓN

La Tabla 1 muestra la metodología general para la ejecución de la filtración a través de diferentes medios. El eluato o solución concentrada de quistes, producto de los procesos de filtración, es pasado por una segunda filtración a través de membranas de 25 mm de diámetro, para lo cual se sugiere que se pasen por una solución colorante, y luego por etanol en concentraciones crecientes (Spaulding *et al.* 1983). Luego, la membrana es colocada en un portaobjetos con glicerol-propionato y observada al microscopio o de inmediato en un hemacitómetro (Rose *et al.* 1992). De estos procedimientos la observación del concentrado en membranas resultó ser más confiable que el conteo en el hematocitómetro (Rose *et al.* 1992). Sin embargo, la eficiencia de la técnica disminuye con la turbidez del agua. Por lo que en aguas turbias como las provenientes de ríos, lagos y piscinas de oxidación ha sido difícil la detección de quistes de *Giardia* o de ooquistes de *Cryptosporidium*, ya que las partículas propician el taponamiento rápido de la membrana (AWWA 1985, Rose *et al.* 1991, Rose *et al.* 1992, Ho *et al.* 1995). Además, la alta turbidez ocasiona confusión de los quistes y ooquistes con algas u otras partículas (APHA 1992).

Otra técnica de filtración muy usada es la propuesta por Hansen y Ongerth (1991), con una eficiencia hasta de un 40 % para la recuperación de quistes de *Giardia* y un 28 % para ooquistes de *Cryptosporidium* (Tabla 1) (Ongerth 1989, Hansen y Ongerth 1991). Un estudio realizado con membranas de policarbonato, nitrato de celulosa y acetato de celulosa demostró que la membrana de nitrato de celulosa presentó mejores porcentajes de recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* (Shepherd y Wyn-Jones 1995). Otros estudios muestran que la recuperación con

membranas de policarbonato para quistes de *Giardia* (49 %) es mayor que la de los ooquistes de *Cryptosporidium* (9 %) (Nieminski *et al.* 1995). Adicionalmente, Graczyk *et al.* (1997) aseguran que incubando la suspensión de ooquistes de *Cryptosporidium* filtrada a través de filtros de acetato de celulosa con acetona, centrifugando y realizando una tinción de inmunofluorescencia, se puede recuperar ooquistes y quistes. Además, se logra discernir la viabilidad e infectividad de quistes de *Giardia* u ooquistes *Cryptosporidium*. Asimismo, Falk *et al.* (1998) consideran este método eficiente para la recuperación de quistes de *Giardia* (78.7 %), aunque es menos eficiente para los ooquistes de *Cryptosporidium* (42.1%). Un hallazgo importante de este grupo fue haber determinado que la concentración inicial de los quistes de *Giardia* o de los ooquistes de *Cryptosporidium* no influye en la eficiencia de recuperación de la técnica.

La filtración a través de cartuchos de polipropileno propuesta por Musial *et al.* (1987), superó los porcentajes de recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium* (80-90 %), similares resultados fueron encontrados en otros estudios (Payment *et al.* 1989, Rose *et al.* 1989). Holman *et al.* (1983) probaron filtros de cartucho de polipropileno orlon de una porosidad de 1 μm y 7 μm , mostrando que la porosidad de 1 μm permite la mayor eficiencia en la recuperación de quistes de *Giardia*. Con esta porosidad, Shepherd y Wyn-Jones (1995) filtraron aguas superficiales a través de cartuchos con tres tipos diferentes de filtros: Cuno MicroWynd II; Cokes polyfil y Balston grado 50, de los cuales el primero fue el mejor para recuperar quistes de *Giardia*. Un estudio realizado por LeChevallier y Norton (1995) muestra que la retención del filtro Cuno MicroWynd II es del 84 % para ooquistes de *Cryptosporidium* y del 80 % para quistes de *Giardia*. A pesar del grado de detección alcanzado por la misma, Vessey y Slade (1991) afirman que las centrifugaciones realizadas durante el procesamiento de la muestra afectan la detección de los ooquistes, de tal manera que a altas velocidades de centrifugación existe una baja detección de los ooquistes, debido a que posiblemente la destrucción de los epitopes no permite que se

unan los anticuerpos marcados con fluoresceína (Shepherd y Wyn-Jones 1995). El proceso de sonicación también parece ocasionar déficit en la detección de ooquistes, por alteración de la estructura ooquistica (Tabla 1) (Rose *et al.* 1989, Shepherd y Wyn-Jones 1995, Vessey y Slade 1991). Nieminski *et al.* (1995) afirmaron que la eficiencia de recuperación de quistes de *Giardia* es de tan sólo un 12% y de un 8% para ooquistes de *Cryptosporidium*. Sin embargo, esta técnica ha sido la alternativa propuesta por la Environmental Protection Agency (EPA 1992) para estudios ambientales de quistes de *Giardia*, ooquistes de *Cryptosporidium* y virus entericos (APHA 1992, Kfir *et al.* 1995).

El uso de la filtración por filtros-múltiples de flujo tangencial permitió la mayor recuperación de quistes u ooquistes que la filtración a través de membranas o de cartuchos de polipropileno (Tabla 1) (Isaac-Renton *et al.* 1986).

ANTICUERPOS MARCADOS CON MAGNETITAS

Como se expresó anteriormente, las técnicas de filtración presentan interferencia al aumentar la turbidez de la muestra, este hecho impulsó estudios para establecer métodos que permitan investigar muestras con alta turbidez (600 NTU). Bifulco y Schaefer (1993), idearon la utilización de anticuerpos marcados con magnetitas para concentrar quistes de *Giardia*. La metodología propuesta en este estudio se muestra en la Tabla 2, la cual reporta una alta eficiencia de recuperación de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en aguas con alta turbidez, lo cual permite sugerir esta técnica para recuperar quistes desde aguas residuales o de ríos, con alta concentración de detritos. Mahbubani *et al.* (1998) corroboraron la alta eficiencia que muestra esta técnica con respecto a otras para la recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* desde aguas residuales o de cuencas.

FLOCULACIÓN

Fue propuesta inicialmente para la recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras de agua por Vessey *et al.* (1993) y

utilizada por Botero *et al.* (1996) para la determinación de quistes de *Giardia* de aguas residuales (Tabla 1). En aguas de río los quistes de *Giardia* se recuperaron en un 61 % (Ho *et al.* 1995) y en aguas negras la recuperación fue del 66 % (Botero *et al.* 1996). El promedio de eficiencia de la técnica para la recuperación de quistes de *Giardia* fue de un 75 % (Botero *et al.* 1996). Los ooquistes de *Cryptosporidium* fueron recuperados un 70 % en aguas corrientes y un 33 % en aguas de río (Shepherd y Wyn-Jones 1995). Por consiguiente esta técnica es recomendable para estudios de *Giardia* y *Cryptosporidium* en aguas residuales, ríos, lagos, etc. (Botero *et al.* 1996, Drozd y Schwartzbrod 1996, Ho *et al.* 1995). Esta técnica se ha utilizado en la detección de quistes de *Giardia* en aguas residuales provenientes de diferentes sistemas de tratamientos, con muy buenos resultados en la recuperación de estas estructuras (Pertuz *et al.* 1995, Pertuz 1996, Pertuz y Jiménez 1996).

En términos generales la técnica de mayor eficiencia para la recuperación de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* fue la que agregó el paso de concentración con anticuerpos marcados con magnetita (Tabla 2).

TÉCNICAS DE CLARIFICACIÓN

La suspensión concentrada de quistes u ooquistes es sometida a un proceso de clarificación para eliminar detritos de las muestras y así optimizar la detección e identificación de las estructuras parasitarias; las técnicas de clarificación son de dos tipos: Flotación y Sedimentación (Rose *et al.* 1992).

La clarificación por flotación es la de mayor uso en la eliminación de detritos de los extractos concentrados. Se fundamenta en el uso de soluciones que tengan la misma densidad de los quistes del protozooario que se estén analizando. Entre las soluciones utilizadas con mayor frecuencia se mencionan: sacarosa, cloruro de sodio, sulfato de cinc, cloruro de cesio, etc. (AWWA 1985). Los pasos generales consisten en la adición del concentrado proveniente del paso de filtración, floculación o concentración con

anticuerpos magnetitas a la solución flotante (sacarosa, percoll-sacarosa, sulfato de cinc) con la densidad específica para quistes de *Giardia* o de los ooquistes de *Cryptosporidium* y la posterior centrifugación; las capas de interfase y la superior son extraídas cuidadosamente y sometidas a varios lavados con Tween-Buffer de fosfato salino (PBS) u otro "buffer" (AWWA 1985, Rose *et al.* 1992). El "pellet" obtenido por esta operación es preservado hasta el paso de tinción. Se admite que las técnicas de flotación tienen la desventaja de causar pérdidas de ooquistes o quistes durante el proceso, produciendo resultados por debajo de los valores reales (Gilmour *et al.* 1991, Kfir *et al.* 1995, LeChevallier *et al.* 1995, Nieminski *et al.* 1995). Sin embargo, las pérdidas son menores con la técnica de flotación con percoll-sacarosa, la cual presenta hasta un 80 % de recuperación de quistes u ooquistes en muestras con altas cantidades de detritos (Gilmour *et al.* 1991, Bifulco y Schaefer 1993). Recientemente, Nieminski *et al.* (1995) reportan el uso de flotación con percoll-sacarosa con una recuperación del 89 % de quistes de *Giardia* y del 69 % de ooquistes de *Cryptosporidium* desde muestras de agua superficial.

La clarificación por sedimentación está fundamentada en la utilización de soluciones como: Formalina-Eter, formalina o formalina-etil acetato, que disuelven los lípidos y remueven el material orgánico y hacen sedimentar los quistes (Rose *et al.* 1992). Su aplicación en la clarificación de quistes de *Giardia* se limita sólo a muestras de aguas residuales con alta cantidad de detritos o muestras de lodo provenientes de sistemas de tratamiento de descargas residuales (Ho *et al.* 1995, Pertuz *et al.* 1995, Pertuz 1996). Su utilización generalmente se acompaña de un paso posterior de flotación con sacarosa o sulfato de cinc (AWWA 1985, Ellis *et al.* 1993). Los ooquistes de *Cryptosporidium* no son usualmente clarificados mediante esta técnica (Rose *et al.* 1992). En general el método consiste en la aplicación de soluciones de formalina-éter o etil acetato a un extracto concentrado, se centrifuga y luego el "pellet" obtenido se lava varias veces con solución salina, éste se observa al microscopio de luz (Pertuz 1996). Diversos estudios han

utilizado está técnica para la clarificación de muestras de aguas residuales con buenos resultados en la eliminación de detritus de las mismas (Ho *et al.* 1995, Pertuz *et al.* 1995, Pertuz 1996). Las muestras de lodo han sido procesadas también con este método, pero aún se mantienen cantidades considerables de detritus que interfieren con las técnicas de tinción (Pertuz *et al.* 1995, Pertuz 1996, Pertuz y Jiménez 1996).

TÉCNICAS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

TINCIÓN

Generalmente son realizadas sobre muestras de aguas concentradas y clarificadas con la finalidad de detectar e identificar los quistes u oquistes recuperados. Estas son utilizadas para la identificación de *Giardia* y *Cryptosporidium* en muestras fecales, su utilización ha sido necesaria para la evaluación de los cuerpos de agua (Rose *et al.* 1992). Smith *et al.* (1989) probaron varios métodos de tinción para verificar la presencia de oquistes de *Cryptosporidium* de los cuales destacan: Zielh Neelsen modificada, Fenol auramina O, Safranina - Azul de Metileno y Wright - Giemsa, las cuales han sido utilizadas también en otros estudios (García *et al.* 1983, Stibbs y Ongerth 1986, Pertuz 1996). Para determinar la presencia de quistes de *Giardia* se ha propuesto el uso de tinciones permanentes de hematoxilina y tricromica (Ellis *et al.* 1993, Pertuz 1996, Pertuz y Jiménez 1996). Estas técnicas realizan básicamente la preparación de un frotis, la fijación, la adición de un colorante, adición de un decolorante, la adición de un colorante de contraste y varios lavados con agua, ejecutados entre cada paso mencionado. Los métodos de tinción se caracterizan por presentar un colorante, un decolorante y un colorante de contraste, cada uno de ellos varía con la batería de tinción (Tabla 3).

El estudio realizado por Smith *et al.* (1989), en muestras de agua sembradas con oquistes de *Cryptosporidium* encontró que la tinción Zielh Neelsen modificada mostró un 80 % de eficiencia en la detección de los mismos, siendo esta técnica de coloración la que

mayor eficiencia presentó en diferentes tipos de agua. Sin embargo, un bajo porcentaje de detección fue hallado en aguas tratadas con mezclas floculantes como hidróxido de aluminio y en aguas superficiales provenientes de ríos o lagos (Smith *et al.* 1989). Debido a que las partículas del floculante u otros detritos presentes en el agua ocasionan serios problemas de interferencia al no permitir la diferenciación adecuada de los ooquistes. La misma tendencia mostró la tinción con Auramina O-Fenol. Las otras técnicas de tinción mencionadas mostraron baja sensibilidad para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium*, mientras que en muestras de agua provenientes de cuencas relacionadas con brotes, la técnica de Zielh Neelsen fue la más eficiente para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* (Smith *et al.* 1989).

La tinción tricromica fue superior a la tinción del frotis con hematoxilina para la detección de quistes de *Giardia* en un ensayo realizado con ambas técnicas por Pertuz (1996), con un 50 % para la primera, en aguas residuales crudas y tratadas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela.

INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia puede ser directa e indirecta, esta última es aplicada comúnmente en muestras ambientales (Rose *et al.* 1989). La inmunofluorescencia directa (Tabla 2) ha sido utilizada tanto para la detección de quistes de *Giardia* como ooquistes de *Cryptosporidium* (Riggs *et al.* 1991, LeChevallier y Norton 1995). Estas estructuras son observadas de color verde manzana fluorescente en la pared externa, forma oval o hueso para quistes de *Giardia* y media luna para ooquistes de *Cryptosporidium* y el tamaño característico de cada estructura. La confirmación se realiza por microscopía de contraste de fase buscando estructuras internas: axonemas, cuerpos medios y núcleos. Una evaluación de varios anticuerpos monoclonales para *Giardia* y *Cryptosporidium* mostró mayor detección de ooquistes y quistes en muestras ambientales provenientes de cuencas, aguas cloacales, suministros de agua potable, etc. (Rose *et al.* 1989). Los anticuerpos policlonales fueron

probados con muy buenos resultados en la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes *Giardia* en diferentes muestras de agua. Similarmente, la inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales se experimentó sobre muestras ambientales para detectar quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium*, utilizando filtración por membranas de acetato de celulosa y concentradas con gradiente percoll-sacarosa, obteniéndose excelentes resultados (Portincasa *et al.* 1997).

NUEVOS MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE *GIARDIA* Y *CRYPTOSPORIDIUM* EN MUESTRAS AMBIENTALES

La necesidad de encontrar métodos que ofrezcan la detección de las formas infectantes en muy bajas concentraciones, la viabilidad de estas formas encontradas y evitar la confusión con otros organismos, ha dado origen al uso de las técnicas de: Sondas genéticas y la amplificación Polimerase Chain Reaction (PCR) o reacción en cadena de la polimerasa.

SONDA GENÉTICA

Esta técnica es definida como un fragmento de ácido nucleico con una secuencia conocida, tipificada y caracterizada como propia del agente infeccioso determinado. Dichas sondas pueden ser de dos tipos: Sondas radiomarcadas y sondas no radiomarcadas. Las primeras, son localizadas por autorradiografía, luego de desnaturalizadas e hibridizadas a un soporte sólido con el ácido nucleico blanco. Las segundas, utilizan haptenos para el marcaje, los cuales originan productos coloreados anti-haptenos solubles e insolubles al adicionar el sustrato específico. Estudios preliminares lograron producir un clon específico de ADN de *Giardia* a partir de muestras de heces, el cual es hoy aplicado para detectar este parásito en aguas y en heces. La sensibilidad reportada para esta sonda fue de un nanogramo (ng) de ADN en suspensiones sembradas (Abbaszadegan *et al.* 1991).

Abbaszadegan *et al.* (1991) aplicaron la técnica de sondas genéticas para la detección de quistes de *Giardia* en muestras de

agua (Tabla 4) obteniendo alta sensibilidad y especificidad para la detección de quistes de *Giardia* (1-5 quistes por litro).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Es la amplificación de fragmentos de ácidos nucleicos usando un oligonucleico iniciador de secuencia definida que se une a la región blanco a ser amplificada (Mullis 1990, Bej *et al.* 1991) (Tabla 4). Al igual que la técnica anterior, ésta mostró alta sensibilidad (10^2 a 10^3 ooquistes por cada 100 litros) y especificidad al ampliar un gen de *Giardia*, lo que permite diferenciarla de otros microorganismos (Mahbubani *et al.* 1991, Paszko-Kolva *et al.* 1996, Mahbubani *et al.* 1998, Chung *et al.* 1998). Se distinguen quistes vivos de muertos al usar ARN amplificado y luego detectándolo espectrofotométricamente a Å (260 nm) o sobre geles (Mahbubani *et al.* 1991). Actualmente se ha empleado la reacción en cadena de la polimerasa junto a la concentración con anticuerpos marcados con magnetitas, aumentando la sensibilidad en la detección de los ooquistes de *Cryptosporidium* (Griffin y Rose 1996) (Tabla 4). Una comparación de la PCR con microscopía de fluorescencia y ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) o ensayo de inmunoabsorción de enzima ligada realizada por Chung *et al.* (1998), demostraron que la misma detecta un 84 % de ooquistes de *Cryptosporidium* con respecto a la inmunofluorescencia indirecta o ELISA resultando ser muy eficiente para la detección del parásito aún en aguas negras no tratadas. Una modificación que se ha venido trabajando es el aislamiento del ARN mensajero que junto al uso de una transcriptasa reversa han mejorado notablemente la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* desde el agua durante un brote diarreico y en muestras de agua obtenidas de diferentes ambientes (Moses *et al.* 1997, Rochelle *et al.* 1997a, Kaucner y Stinear 1998).

Sluter *et al.* (1997) y Rochelle *et al.* (1997b) establecieron que se consigue un mejor rendimiento en la identificación y recuperación de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras de agua, al aplicar tres ciclos de amplificación por PCR evitando así la interferencia que pueda ocasionar la presencia de otras partículas

contenidas en las aguas superficiales tales como arcilla, metales, algas etc., una vez que son analizadas las muestras.

TÉCNICAS PARA DETERMINAR VIABILIDAD DE *GIARDIA* Y *CRYPTOSPORIDIUM* EN EL AMBIENTE

Conocer la viabilidad de los quistes u ooquistes en el ambiente es de suma importancia tomando en cuenta la baja dosis infectiva que presentan estos parásitos (entre 10 y 100 quistes u ooquistes) (Meyer y Jarroll 1980, Campbell *et al.* 1992). Las técnicas empleadas para tal fin se basan en modelos de exquistación en vivo y en vitro (Wallis 1993). El método en vitro consiste en un paso de incubación en una solución peptonada-protesa (0.5%) preparada en buffer fosfato salino (pH 7.00), durante 45 min. Los quistes intactos, vacíos y los trofozoítos parcialmente exquistados son cuantificados (Jarroll *et al.* 1981, Isaac-Renton *et al.* 1992, Sauch *et al.* 1991, Labatiuk *et al.* 1992, Wallis 1993). Los ooquistes de *Cryptosporidium* también han sido exquistados en vitro (Labatiuk *et al.* 1992), éstos son incubados en una solución Bilis en medio esencial de Hank y carbonato de hidrogeno con los ooquistes purificados (Campbell *et al.* 1992, Robertson *et al.* 1992). El método en vivo se realiza con gerbils, para esto la suspensión de quistes u ooquistes es inoculada en estos animales; las heces y el intestino son analizados para determinar la presencia de trofozoítos o esporozoítos (Isaac-Renton *et al.* 1992, Isaac-Renton *et al.* 1993). Ambos métodos son efectivos para la exquistación, pero implican dificultad metodológica, por lo que el uso de Propidio de Iodo (PI) ó 4,6-Diamidino-2 fenil indol (DAPI) han venido sustituyendo las técnicas de exquistación, ya que demuestran viabilidad en la misma proporción que los modelos anteriores (Sauch *et al.* 1991, Labatiuk *et al.* 1991, Campbell *et al.* 1992, Robertson *et al.* 1992, Campbell y Smith 1996). Estos reactivos son incubados con la suspensión de quistes u ooquistes y luego observados en microscopio de epifluorescencia (Sauch *et al.* 1991, Campbell *et al.* 1992, Robertson *et al.* 1992). Dowd y Pillai (1997) encontraron buenos resultados al emplear PI (propidio de iodo) con la inmunofluorescencia indirecta para detectar y determinar la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de

Giardia recuperados de muestras ambientales. Los modelos de exquistación también son utilizados para cultivar quistes u ooquistes y realizar pruebas moleculares que certifiquen la presencia del parásito en el ambiente. Isaac-Renton *et al.* (1993), estandarizaron un método de cultivo de *Giardia* mediante el cual se realizaron estudios epidemiológicos en brotes transmitidos por agua. En términos generales los quistes de *Giardia* aislados del ambiente son inoculados en gerbils, dos semanas después son estudiadas las heces y los intestinos de estos animales. Los trofozoítos encontrados son cultivados en un medio específico a 37 °C y observados en microscopía de inversión. Posteriormente, los trofozoítos aislados son preservados y sometidos a diferentes análisis moleculares (Isaac-Renton *et al.* 1992, Isaac-Renton *et al.* 1993).

Estos estudios demostraron que el método de exquistación en vivo es superior al mismo método in vitro, encontrando muy bajas concentraciones de quistes en el ambiente (Isaac-Renton *et al.* 1992, Isaac-Renton *et al.* 1993). Los ooquistes de *Cryptosporidium* se inocularon en monocapas celulares sobre portaobjetos, se extrae el RNAm (RNA mensajero) del patógeno para la proteína de choque térmico 70 hsp (proteína chaperonina) y se amplifica por PCR después de aplicar una transcriptasa reversa. Los concentrados ambientales de *Cryptosporidium* fueron inoculados sobre los cultivos y los estados de infectividad fueron detectados con anticuerpos fluorescentes contra las proteínas 70 hsp. Esta metodología fue efectiva para probar la detección e infectividad desde muestras ambientales (65 a 100 litros) tanto para ooquistes de *Cryptosporidium* como quistes de *Giardia* (Abbaszadegan *et al.* 1997, Rochelle *et al.* 1997a).

CONCLUSIÓN

Las técnicas aquí recopiladas son las de mayor uso para la recuperación e identificación de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en suministros de agua, aguas residuales y otras fuentes de agua. Los estudios dirigen la atención sobre los métodos

TABLA 1. Comparación de las técnicas de concentración para quistes de *Giardia* y oocistos de *Cryptosporidium*.

CARACTERÍSTICAS	MNC ¹	MP	CP	CM	F
Tamaño Membrana	47 mm diámetro, 5µm de poro	233 mm diámetro, 2 µm de poro	1 µm de poro	1.2µm de poro	-
Disposición Membrana	Filtración clásica.	Filtración por platos.	Cartucho de plástico.	Hilera de membranas en cassette.	-
Volumen	250 ml a 1 L	5 a 20 Gal.	380 L.	> 380 L.	10 L.
Pasos Generales	<ul style="list-style-type: none"> • Elución de la capa sobre la membrana. • Cuantificación en hematocitómetro o micromembrana. 	<ul style="list-style-type: none"> • Elución de la capa sobre la membrana • Clarificación, cuantificación e identificación por inmunofluorescencia (IF). 	<ul style="list-style-type: none"> • Reflujo del eluyente. • Corte del filtro y agitación con eluato. • Homogeneización y sonicación. • Clarificación, cuantificación e identificación (IF). 	<ul style="list-style-type: none"> • Separación tangencial en filtro y solución concentrada (250 ml). • Clarificación e identificación (IF). 	<ul style="list-style-type: none"> • Agregar, NaHCO₃. • Ajustar a pH 10 con NaOH. • Dejar reposar a temperatura ambiente. • Descartar sobrenadante. • Disolver floculado con ácido sulfamínico. • Clarificación e identificación (IF).

TABLA 1.- Cont.

Eficiencia	0 %	49 %	12 %	50 %	75 %
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Metodología sencilla. • Mejores resultados en micromembranas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Filtración de grandes volúmenes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Manejo de grandes volúmenes. • Transporte al campo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Manejo de grandes volúmenes. • Rapidez. • No se necesitan pasos adicionales de concentración. 	<ul style="list-style-type: none"> • Metodología sencilla. • Uso con alta turbidez. • Rapidez.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Taponamiento de membrana con muestras de alta turbidez. • Poco sensible. 	<ul style="list-style-type: none"> • Taponamiento de membrana con muestras de alta turbidez. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de quistes en fibras del filtro y otros procesos asociados a la clarificación (sonicación y centrifugaciones). 	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de quistes durante el flujo a través del sistema. • No portátil. 	<ul style="list-style-type: none"> • Interferencia con partículas en caso que no ocurra la buena disolución del floculado.
Referencias	APHA 1992	Hansen y Ongerth 1991	Musial <i>et al.</i> 1987	Isaac-Renton <i>et al.</i> 1986	Ho <i>et al.</i> 1995

¹ MNC: Membrana de nitrocelulosa; MP: membrana de policarbonato; CP: cartucho de polipropileno; CM: cassette pellicon-system; F: floculación.

TABLA 2. Comparación de las técnicas inmunológicas usadas en los procesos de detección de quistes de *Giardia* y oocistos de *Cryptosporidium*.

CARACTERÍSTICAS	IF1 ¹	IFD	AM
Uso	Identificación.	Identificación.	Reconcentración.
Pasos Técnicos	<ul style="list-style-type: none"> • Filtración. • Microfiltración a través de membrana de 25 mm de diámetro. • Paso de antisuero. • Incubación. • Lavado PBS-Tween. • Paso de conjugado IgG-FITC de cabra anti-conejo. • Coloración de contraste. • Microscopía. 	<ul style="list-style-type: none"> • Filtración. • Microfiltración a través de membrana de 25 mm de diámetro. • Paso de coloración de contraste. • Paso de suero inmunizado marcado con FITC. • Incubar. • Microscopía. 	<ul style="list-style-type: none"> • Filtración. • Concentración por clarificación. • Incubación del concentrado con el antisuero anti-<i>Giardia</i>. • Incubación con Magnetita coloidal e hilo de acero inoxidable. • Separación magnética. • Descartar sobrenadante. • Agregar buffer TBE 90. • Agitar para despegar quistes del alambre. • Microscopía IF.

TABLA 2.- Cont.

Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad (0.25 quistes). • Identificación de quistes por coloración verde manzana brillante. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad (0.25 quistes). • Identificación de quistes por coloración verde manzana brillante. 	<ul style="list-style-type: none"> • Detecta quistes en aguas de alta turbidez. • Asegura concentraciones de quistes.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Interferencia por reacciones cruzadas. • No informa viabilidad. • Interferencia en aguas fuertemente clorinadas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Interferencia por reacciones cruzadas. • No informa viabilidad. • Interferencia en aguas fuertemente clorinadas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Metodología tediosa • No informa viabilidad
Eficiencia	90 %	90 %	82 %
Referencia	Rose <i>et al.</i> 1989	Rose <i>et al.</i> 1989	Bifulco y Schaefer 1993

¹ IFT: Inmunofluorescencia Indirecta, IFD: inmunofluorescencia directa, AM: Anticuerpos monoclonales.

TABLA 3. Tinciones y sus reactivos.

TINCIÓN	COLORANTE	DECOLORANTE	CONTRASTE
Zielh Neelsen	Fuchsin-Fenilada	Alcohol clorhídrico	Azul de Metileno
Fenol - Auramina O	Auramina O	Alcohol clorhídrico	Permanganato de Potasio
Safranina	Azul de Metileno	-	Safranina O
Wright-Giemsa.	Giemsa-Wright	-	-

TABLA 4. Comparación de las metodologías de PCR y sondas genéticas.

CARACTERÍSTICAS	PCR ¹	SONDAS GENÉTICAS
Pasos Técnicos	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturalización térmica. • "Annealing" de los ácidos nucleicos iniciadores al ADN blanco. • Síntesis del ADN usando la TAP ADN polimerasa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Extracción del ADN y ARN. • Colocar la muestra sobre la membrana ("Immunoblotting"). • Cocido "bake". • Prehibridización. • Hibridización con sonda P³². • Autorradiografía.
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad y especificidad. • Distingue quistes vivos de muertos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad y especificidad.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Alto costo metodológico. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto costo metodológico. • No distingue quistes vivos de muertos. • No detecta ADN crudo o soluble.
Eficiencia	Alta.	Alta.
Referencia	Mahbabuni <i>et al.</i> 1991	Abbaszadegan <i>et al.</i> 1991

¹ Reacción en cadena de la Polimerasa o polimerase chain reaction.

que ofrezcan mayor sensibilidad, como los que manejan ADN, de los cuales la reacción en cadena de la polimerasa es la más sensible. Sin embargo, el uso de anticuerpos marcados con magnetita se ha convertido en una buena opción para detectar quistes de *Giardia* y oocistos de *Cryptosporidium* desde muestras de aguas negras o de ríos de gran turbidez. No obstante, los métodos de filtración junto a la inmunofluorescencia constituyen los más comunes a pesar de las pérdidas económicas que arrojan.

Los países subdesarrollados aún tienen la desventaja de no poder acceder a los métodos más sensibles, debido la inversión que estos representan, por lo que actualmente se están investigando técnicas alternativas menos costosas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Edith Mabel Cuñarro por su asesoría metodológica.
A los árbitros por su dedicación en la revisión del manuscrito.

LITERATURA CITADA

- ABBASZADEGAN, M., C. P. GERBA Y J. B. ROSE. 1991. Detection of *Giardia* cysts with a cDNA probe and applications to water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 927-931.
- ABBASZADEGAN, M., M. S. HUBER, C. P. GERBA E I. L. PEPPER. 1997. Detection of viable *Giardia* cysts by amplification of heat shock-induced mRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 324-328.
- AHMAB, R. A., E. LEE, I. T. L. TAN Y A. G. MOHAMAD-KAMEL. 1997. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in raw and treated water from two water treatment plants in Selangor, Malaysia. *Wat. Res.* 31: 3132-3136.
- AKIN, E. Y W. JAKUBOWSKI. 1986. Drinking water transmission of Giardiasis in the United States. *Wat. Sci. Tech.* 18: 219-226.

- ANDERSSON, Y. Y B. DE JONG. 1989. An outbreak of Giardiasis and amoebiasis at a ski resort in Sweden. *Wat. Sci. Tech.* 21: 143-146.
- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION) 1992. *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (18 ed.). Washington, DC: APHA, AWWA, WPCT.
- AWWA (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION) 1985. *Giardia lamblia* in water supplies, detection, occurrence and removal. USA: AWWA, pp. 1-50.
- BEJ, A. K., R. J. STEFFAN, J. DICESARE, L. HAFF Y R. M. ATLAS. 1991. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 307-314.
- BENTON, C., G. I. FORBES, G. M. PATERSON, J. C. M. SHARP Y T. S. WILSON. 1989. The incidence of waterborne and water-associated disease in Scotland from 1945 to 1987. *Wat. Sci. Tech.* 21: 125-129.
- BIFULCO, J. M. Y F. W. SCHAEFER III. 1993. Antibody-magnetite method for selective concentration of *Giardia lamblia* cysts from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 772-776.
- BOTERO, L., W. QUINTERO, Z. MEDINA Y C. OLIVEROS. 1996. Quistes de *Giardia* en aguas negras. *Kasmera.* 24: 83-91.
- BOUHOUM, K., O. AMAHMID, K. HABBARI Y J. SCHWARTZBROD. 1997. Fate of helminth eggs and protozoan cysts in an open channel receiving raw wastewater from Marrakech. *Revue des Sciences de L'Eau.* 10: 217-232.
- BRAIDECH, T. Y R. KARLING. 1985. Causes of a waterborne Giardiasis. *J. AWWA.* 77: 97-99.
- CAMPBELL, A. T., L. J. ROBERTSON Y H. V. SMITH. 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro

excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3488-3493.

CAMPBELL, A. T. Y H. V. SMITH. 1996. Inmunomagnetisable separation of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples. Health related water microbiology, 1996, Mallorca, p. 125.

CRABTREE, K., R. RUSKIN, S. SHAW Y J. B. ROSE. 1996. The detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in cistern water in the US Virgin Islands. Wat. Res. 30: 208-216.

CRAUN, G. F. 1988. Surface water supplies and health. J. AWWA. 80: 40-52.

CHACÍN-BONILLA, L., M. MEJÍA, G. CANO, N. GUANIPA, J. ESTEVEZ Y E. BONILLA. 1993. *Cryptosporidium* infection in a suburban community in Maracaibo, Venezuela. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49: 63-67.

CHANGO, Y. Y H. IRIARTE. 1996. Enteroparasitosis en alumnos de la Escuela Básica "Dr. Jesús Ma. Portillo" del Municipio Maracaibo, Estado Zulia. Tesis de Grado, La Univ. del Zulia, Maracaibo, Venezuela, pp. 17-26.

CHUNG, E., J. E. ALDOM, A. H. CHAGLA, M. KOSTRZYNSKA, H. LEE, G. PALMATEER, J. T. TREVORS, S. UNGER Y S. DEGRANDIS. 1998. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in municipal water samples by the polymerase chain reaction. J. Microbiol. Meth. 33: 171-180.

DE LUCA, M. M., B. C. PEZZANI, M. A. CORDOBA Y J. A. BASUALDO. 1997. Characterization and quantification of parasite species in the effluents of the Berisso main sewage channel, Buenos Aires, Argentina. Zentralblatt Fur Hygiene Uud Umweltmedizin. 200: 349-357.

- DOWD, S. E Y S. D. PILLAI. 1997. A rapid viability assay for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts for use in conjunction with indirect fluorescent antibody detection. *Can. J. Microbiol.* 43: 658-662.
- DROZD, C. Y J. SCHWARTZBROD. 1996. Detection of *Cryptosporidium* in water by flocculation and determination of the viability of the concentrated oocysts. *Health related water microbiology 1996, Mallorca*, p. 97.
- ELLIS, K., P. RODRÍGUEZ Y C. GÓMEZ. 1993. Parasite ova and cysts in waste stabilization ponds. *Wat. Res.* 27: 1455-1460.
- EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) 1992. Manual guidelines for water reuse. Washington, DC: EPA, pp. 1-50.
- FALK, C., P. KARANIS, D. SCHOENEN Y H. M. SEITZ. 1998. Bench scale experiments for the evaluation of a membrane filtration method for the recovery efficiency of *Giardia* and *Cryptosporidium* from water. *Wat. Res.* 32:565-568.
- FRASER, D. 1994. Epidemiology of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* infections in childhood. *Israel J. Med. Sci.* 30: 356-351.
- FRASER, G. 1991. *Giardia* and water supply. *New Zealand Med. J.* 30: 203-204.
- GARCÍA, L., D. BRUCKNER, T. BREWER Y R. SHIMIZU. 1983. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 18: 185-190.
- GASSMANN, L. Y J. SCHWARTZBROD. 1991. Wastewater and *Giardia* cysts. *Wat. Sci. Tech.* 24: 183-186.
- GILMOUR, R. A., H. V. SMITH, P. G. SMITH, G. P. MORRIS Y R. W. A. GIRDWOOD. 1991. The occurrence and viability of *Giardia* spp. cysts in UK waters. *Wat. Sci. Tech.* 24: 179-182.

- GRACZYK, T. K., R. FAYER, M. R. CRANFIELD Y R. OWENS. 1997. *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from water with the membrane filter dissolution method retain their infectivity. J. Parasitol. 83: 111-114.
- GRIFFIN, D. W. Y J. B. ROSE. 1996. The use of immunomagnetic separation (IMS) to enhance PCR detection of *Cryptosporidium* oocysts in environmental samples. Health related water microbiology 1996, Mallorca, p.148
- GRIMASON, A., H. SMITH, W. THITAL, P. G. SMITH, M. JACKSON Y R. W. A. GIRDWOOD. 1993. Occurrence and removal of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in Kenyan waste stabilization ponds. Wat. Sci. Tech. 27: 97-104.
- HANSEN, J. S. Y J. E. ONGERTH. 1991. Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2790-2795.
- HASS, C. N. Y J. B. ROSE. 1995. Developing an action level for *Cryptosporidium*. J. AWWA. 89: 81-95.
- HERNÁNDEZ, S., I. CASANOVA, C. ACEVEDO Y A. MALAESPINA. 1995. Enteroparasitosis en escolares de dos unidades educativas rurales del Estado Zulia. Tesis de Grado, La Univ. del Zulia, Maracaibo, Venezuela, pp. 16-21.
- HERWALDT, B., G. F. CRAUN, S. STOKES Y D. JURANEK. 1992. Outbreaks of waterborne disease in the Unites States: 1989-90. J. AWWA 84: 129-135.
- HIBLER, C. P. Y C. M. HANCOCK. 1990. Waterborne Giardiasis *en*: Gordon McFeters (ed.), Drinking water microbiology. USA: Brocks/Springer-Verlang, pp. 271-293.
- HO, B. S. W., T. Y. TAM, P. HUTTON Y W. C. YAM. 1995. Detection and enumeration of *Giardia* cysts in river waters of

Hong Kong by flocculation-percoll/sucrose gradient-immunofluorescence method. *Wat. Sci. Tech.* 31:431-434.

HOLMAN, B., F. FROST, B. PLAN, K. FUKUTAKI Y W. JAKUBOWSKI. 1983. Recovery of *Giardia* cysts from water centrifugation vs filtration. *Wat. Res.* 17: 1705-1707.

ISAAC-RENTON, J. L., C. FUNG Y A. LOCHAN. 1986. Evaluation of a tangential-flow multiple filter technique for detection of *Giardia lamblia* cysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:400-402.

ISAAC-RENTON, J. L., H. A. SHAHRIARI Y W. BOWIE. 1992. Comparison of an in vitro method and in vivo method of *Giardia* excystation. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1530-1533.

ISAAC-RENTON J. L., C. CORDEIRO, K. SARAFIS Y H. A. SHAHRIARI. 1993. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *The J. of Infectious Diseases.* 167: 431-440.

JAKUBOWSKY, W., J. SYKORA, C. SORBER, L. CASSON Y P. GAVAGHAN. 1991. Determining Giardiasis Prevalence by examination of sewage. *Wat. Sci. Tech.* 24: 173-178.

JARROLL, E., A. BINGHAM Y E. MEYER. 1981. Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 483-487.

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

KARANIS, P., D. SCHOENEN Y H. M. SEITZ. 1998. Distribution and removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies in Germany. *Wat. Sci. Tech.* 37: 9-18.

KAUCNER, C. Y T. STINEAR. 1998. Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in

- large-volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1743-1749.
- KFIR, R., C. M. HILNER, M. DU PREEZ Y B. BATEMAN. 1995. Studies on the prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in South African water. *Wat. Sci. Tech.* 31: 435-438.
- LABATIUK, C. W., F. W. SCHAEFER III, G. R. FINCH Y M. BELOSEVIC. 1991. Comparison of animal infectivity, excystation and fluorogenic dye as measures of *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3187-3192.
- LABATIUK, C. W., M. BELOSEVIC Y G. R. FINCH. 1992. Factors influencing the infectivity of *Giardia muris* cysts following ozone inactivation in laboratory and natural waters. *Wat. Res.* 26: 733-743.
- LECHEVALLIER, M. W. Y W. D. NORTON. 1995. *Giardia* and *Cryptosporidium* in raw and finished water. *J. AWWA* 87: 54-68.
- LECHEVALLIER, M. W., W. D. NORTON, J. SIEGEL Y M. ABBASZADEGAN. 1995. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:690-697.
- LIN, D. S. 1985. *Giardia lamblia* and water supply. *J. AWWA.* 77: 40-47.
- MADORE, M., J. B. ROSE, C. P. GERBA, M. ARROWOOD Y C. R. STERLING. 1987. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. *J. Parasit.* 73: 702-705.
- MAHBUBANI, M. H., A. K. BEJ, M. H. PERLIN, F. W. SCHAEFER III, W. JAKUBOWSKI Y R. M. ATLAS. 1991. Detection of *Giardia*

cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3456-3461.

- MAHBUBANI, M. H., F. W. SCHAEFER III, D. D JONES Y A. K BEJ. 1998. Detection of *Giardia* in environmental waters by immuno-PCR amplification methods. *Curr. Microbiol.* 36: 107-113.
- MARSHALL, M. M., D. NAUMOVITZ, Y. ORTEGA Y C. R. STERLING. 1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 67-85.
- MEYER, E. A. Y L. E. JARROL. 1980. Giardiasis. *Am. J. Epidemiol.* 111: 1-12.
- MOSES, D., K. POULSEN, A. MOLLER LARSEN Y H. ERNO. 1997. Detection of *Giardia* cysts in water by PCR. *Dansk Veterinaertidsskrift.* 80: 187-189.
- MULLIS, K. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American.* 262: 36-43.
- MUSIAL, C., M. ARROWOOD, C. R. STERLING Y C. P GERBA. 1987. Detection of *Cryptosporidium* in water by using polypropylene cartridge filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:687-692.
- NIEMINSKI, E. C., F. W. SCHAEFER, III Y J. E. ONGERTH. 1995 . Comparison of two methods for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1714-1719.
- ONGERTH, J. E. Y H. H. STIBBS. 1987. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 672-676.
- ONGERTH, J. E. 1989. *Giardia* cysts concentrations in river water. *J. AWWA* 81: 81 -86.
- ONGERTH, J. E., G. HUNTER Y F. DEWALLE. 1995. Watershed use *Giardia* cysts presence. *Wat. Res.* 29: 1295-1299.

- PASZKO-KOLVA, C., R. ATMAR, C. YAMASHIRO, R. BEHARI, C. HURST Y C. PALMER. 1996. The application of PCR and other molecular methods for detection of viruses and other microorganisms in environmental samples. Health Related Water Microbiology 1996, Mallorca, p.61.
- PAYMENT, P., A. BÉRUBÉ, P. PERREAULT, R. ARMON Y M. TRUDEL. 1989. Concentration of *Giardia lamblia* cysts, *Legionella pneumophila*, *Clostridium perfringens*, human enteric viruses and coliphages from large volumes of drinking water, using a single filtration. Can. J. Microbiol. 35: 932-935.
- PAYMENT, P., A. BERTE Y C. FLEURY. 1997. Sources of variation in isolation rate *Giardia lamblia* cysts and their homogeneous distribution in river water entering a water treatment plant. Can. J. Microbiol. 43:687-689.
- PERTUZ, S., J. DE LA ROTTA, I. ARAUJO, L. HERRERA, N. JIMÉNEZ, P. MOLLEDA, G. TORO Y J. CASTEJÓN. 1995. *Giardia* sp. en agua y lodo de lagunas de oxidación: estudios preliminares. Resúmenes, 23^a Jornadas Venezolanas Microbiología, 5 al 8 de Noviembre, 1995, Coro, Venezuela, p. 52.
- PERTUZ, S. 1996. Influencia de la *Eichhornia crassipes* sobre la remoción de quistes de *Giardia* en aguas residuales provenientes de las lagunas de estabilización de La Universidad del Zulia. Tesis de Grado, La Univ. del Zulia, Maracaibo, Venezuela, 62 pp.
- PERTUZ, S. Y N. JIMÉNEZ. 1996. Estudio de quistes de *Giardia* en aguas residuales provenientes de diferentes sistemas de tratamiento biológico. Resúmenes, 13^a Congr. Latinoamer. Microbiol., 1 al 5 de Noviembre, 1996, Caracas, Venezuela, p. 107.
- PORTINCASA, F., G. TORCHETTI, F. DONADIO, M. PANARO, A. LISI, F. MADDALENA, D. CARNIMEO Y O. BRANDONISIO. 1997.

- Evaluation of a method for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Igiene Moderna*. 107: 543-554.
- QUINTERO W., C. OLIVEROS, Z. MEDINA Y L. BOTERO. 1998. Evaluación del uso de lagunas de estabilización para la remoción de quistes de *Giardia*. *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia*. 21: 20-26.
- RIGGS, J., K. DUPUIS, K. NAKAMURA Y D. SPATH. 1991. Detection of *Giardia lamblia* by immunofluorescence. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 698-700.
- ROBERTSON, L. J., A. T. CAMPBELL Y H. V. SMITH. 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3494-3500.
- ROCHELLE, P. A., D. M. FERGUSON, T. J. HANDOJO, R. DE LEON, M. H. STEWART Y R. L. WOLFE. 1997a. An assay combining cell culture with transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2029-2037.
- ROCHELLE, P. A., R. DE LEON, M. H. STEWART Y R. L. WOLFE. 1997b. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 106-114.
- ROSE, J. B., L. K. LANDEEN, K. R. RILEY Y C. P. GERBA. 1989. Evaluation of immunofluorescence technique for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3189-3196.
- ROSE, J. B., C. P. GERBA Y W. JAKUBOWSKI. 1991. Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Environ. Sci. Technol.* 25: 1393-1400.
- ROSE, J. B., C. P. GERBA, G. TORANZOS, M. ABBASZADEGAN, J. NARANJO, L. BOTERO Y M. MORALES. 1992. Avances en la

detección de bacterias enteropatógenas, virus y parásitos en aguas y aguas residuales (Manual). La Univ. del Zulia, Maracaibo, Venezuela, pp. 1-50.

- SAUCH, J. F., D. FLANIGAN, M. CALVIN, D. BERMAN Y W. JAKUBOWSKI. 1991. Propidium Iodine as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3243-3247.
- SHEPHERD, K. Y A. WYN-JONES. 1995. Evaluation of different filtration techniques for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. *Wat. Sci. Tech.* 31: 425- 429.
- SMITH, H. V., A. McDIARMID, A. SMITH, A. HINSON Y R. GILMOUR. 1989. An analysis of staining methods for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water-related samples. *Parasitol.* 99: 323-327.
- SLUTER, S. D., S. TZIPORI Y G. WIDMER. 1997. Parameters affecting polymerase chain reaction of waterborne of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Microbiological and Biotechnology.* 48: 325-330.
- SORBEY, M., A. DUFOUR, C. P. GERBA, M. W. LECHEVALLIER Y P. PAYMENT. 1995. Using a conceptual framework for assessing risks to health from microbes in drinking water. *J. AWWA* 87: 44-48.
- SPAULDING, J. J., R. E. PACHA Y W. CLARK. 1983. Quantification of *Giardia* cysts by membrane filtration. *J. Clin. Microbiol.* 18: 713-715.
- STIBBS, H. Y J. E. ONGERTH. 1986. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *J. Clin. Microbiol.* 24: 517- 521.
- STATES, S., K. STADTERMAN, L. AMMON, P. VOGEL, J. BALDIZAR, L. CONLEY Y J. SYKORA. 1997. Protozoa in river water: Sources, occurrence and treatment. *J. AWWA* 89: 74-83.

- SYKORA, J., C. SORBER, W. JAKUBOWSKI, L. CASSON, P. GAVAGHAN, M. SHAPIRO Y J. SCHOTT. 1991. Distribution of *Giardia* cysts in wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 24: 187-192.
- TEUNIS, P. F. M., G. J. MEDEMA, L. KRUIDENIER Y A. H. HAVELAAR. 1997. Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* or *Giardia* in drinking water from a surface water source. *Wat. Res.* 31: 1333-1346.
- VESSEY, G. Y J. S. SLADE. 1991. Isolation and identification of *Cryptosporidium* from water. *Wat. Sci. Tech.* 24: 165-167.
- VESSEY, G., J. S. SLADE, M. BYRNE, K. SHEPHERD Y C. FRICKER. 1993. A new method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts from water. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 82-85.
- WALLIS, P. M. 1993. Abiotic transmission - Is water really significant? *En*, R. Thompson, J. Reynoldson y A. Lymbery (eds.), *Giardia: from molecules to disease*. CAB International, pp. 99-122.
- WOLFE, M. 1992. Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 5: 93-100.
- ZUCKERMAN, U., D. GOLD, G. SHELEF Y R. ARMON. 1997. The presence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in surface waters and effluents in Israel. *Wat. Sci. Tech.* 35: 381-384.