

Presencia de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en agua potable

Mariangela Bracho¹, Maria Sarcos², Pablo Reyes³ y Ligia Botero^{1*}

¹ Laboratorio de Virología, Centro de Investigaciones del Agua, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia. ² Unidad de Investigación en Microbiología Ambiental, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. ³ Laboratorio de Calidad de Agua del Ministerio de Salud y Desarrollo Social del Estado Zulia, Maracaibo-Venezuela.

Recibido: 04-10-05 Aceptado: 11-05-07

Resumen

Se evaluó la presencia de *G. lamblia* y *C. parvum* en muestras de agua potable provenientes de fuentes subterráneas (FS) y del sistema municipal de suministro (SMS) de la ciudad de Maracaibo. La concentración de protozoarios en las muestras de FS se llevó a cabo en paralelo por la técnicas de formol éter y carbonato de calcio, y por la técnica de filtración por cartucho en las muestra del SMS. La visualización se realizó mediante examen al fresco, tinción temporal con lugol, coloración de Kinyoun y por la técnica de Inmunofluorescencia directa. Los quistes de *G. lamblia* estuvieron presentes en 43,75% de las muestras de FS (18-75 quistes/100L, promedio: 45,2 quistes/100L) y los ooquistes de *C. parvum* en el 68,75% de estas (18-75 ooquistes/100L, promedio: 38,9 ooquistes/100L). En el agua del SMS se detectaron quistes de *G. lamblia* en el 70% de las muestras (2,3-4,8 quistes/100L promedio: 3,3 quistes/100L) y ooquistes de *C. parvum* en 90% (1,2-8,4 ooquistes/100L, promedio: 3,75 ooquistes/100L). El 83,3% de las muestras analizadas incumplieron la normativa venezolana para la calidad del agua potable, por lo que no son aptas para el consumo humano. No se observó correlación entre la presencia de organismos indicadores de contaminación y de protozoarios, encontrándose muestras que fueron negativas para la presencia de organismos indicadores pero positivas para la presencia de parásitos. Esto evidencia las deficiencias que presenta las bacterias indicadoras de contaminación para garantizar la calidad parasitológica del agua potable.

Palabras clave: Agua potable; bacterias indicadoras; *Giardia*; *Cryptosporidium*.

Presence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in drinking water

Abstract

The presence of *G. lamblia* and *C. parvum* evaluated in underground (FS) and municipal drinking water (SMS) samples from the City of Maracaibo. The concentration of protozoa in the FS samples determined simultaneously, under formol-ether and calcium carbonate techniques. Microscopic identification established under lugol, Kinyoun coloration and direct Immunofluorescence. *G. lamblia* cysts and *C. parvum* oocysts detected in 43.75% (18-75/100L, average: 45.2/100L) and 68.75% (18-75/100L, average: 38.9/100L) of FS water samples exami-

* Autor para la correspondencia. E-mail: ligia.botero@gmail.com

ned, respectively. *G. lamblia* cysts and *C. parvum* oocysts detected in 70% of SMS samples (2.3 - 4.8/100L average: 3.3/100L) and 90% (1.2-8.4/100L, average: 3.75/100L), respectively. Eighty three percent (83.3%) of study water samples failed to comply Venezuelan Standards for drinking water quality and theretofore, not recommended for the human consumption. A correlation between presence of indicative-organisms and protozoa not observed; parasites found in study samples with negative presence of indicative-organisms. Analysis of evidence presented corresponds with parasitological contaminated drinking water samples, characterized by the organisms found and not recommended for human consumption. Based on results presented, sole bacteriological quality of water samples is not adequate to determine water potability.

Key words: Drinking water; indicating bacteria; *Giardia*; *Cryptosporidium*.

Introducción

Los protozoarios entericos *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* son parásitos de amplia distribución mundial y de gran importancia en Salud Pública por su indudable acción patógena, pudiendo causar diarrea o gastroenteritis de severidad variable, las cuales dan lugar a un gran deterioro físico, desnutrición y consecuencias negativas en el crecimiento y desarrollo intelectual de los niños (1). En personas inmunocomprometidas la diarrea tiende a ser severa y persistente con un alto grado de morbilidad y mortalidad (2).

Se ha estimado que aproximadamente 200 millones de personas a nivel mundial y el 15% de la población de Latinoamérica están infectadas con *Giardia* y *Cryptosporidium*, con un elevada prevalencia en niños y en el estrato de la población con menos recursos (3). En Venezuela, los reportes de frecuencia de infecciones por *Giardia* spp son del 21%, siendo este el protozoario intestinal de mayor prevalencia en el país (4) y los de *Cryptosporidium* spp. están en el orden de 11,2% (5).

Las parasitosis ocasionadas por estos protozoarios entéricos causan gran ausentismo en los centros de trabajo y baja productividad laboral; además de los altos costos asociados con el tratamiento de salud (1), lo que amerita que se intente detectar las causas de su alta prevalencia y difundir las medidas profilácticas para prevenirlas.

La ingestión de alimentos y/o agua contaminada con *G. lamblia* y *C. parvum* es el principal mecanismo de contagio con estos protozoarios. El hecho de que estos parásitos posean: baja dosis infecciosa de 1- 10 quistes/ooquistes, resistencia elevada a los tratamientos de desinfección y potabilización del agua y debido a su tamaño pequeño, el cual les permite evadir las barreras de tratamiento, hace que estos microorganismos sean de gran relevancia para las plantas de tratamiento de agua y por tanto que deban ser analizados para asegurar la calidad de los sistemas de tratamiento y distribución (6).

En Venezuela se tienen pocos reportes de estudios sobre presencia de parásitos en aguas destinadas al consumo, a pesar de que la normativa del país establece que no deben estar presentes. El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo un estudio diagnóstico para evaluar la presencia de los parásitos *G. lamblia* y *C. parvum* en el agua potable que surte a la ciudad de Maracaibo, determinando además si la presencia de las bacterias indicadores de contaminación es adecuada para determinar la calidad parasitológica del agua.

Materiales y Métodos

Área de estudio

Se analizaron un total de 26 muestras de agua potable en sitios seleccionados por el Laboratorio de Calidad del Agua, del Ministerio de Sanidad y Desarrollo Social del

Estado; 16 de ellas en pozos de explotación y expendio de agua subterránea (FS) establecidos en el municipio San Francisco de la ciudad de Maracaibo y las diez restantes, en diferentes puntos de distribución del Sistema Municipal de Suministro (SMS) de la parroquia Coquivacoa de esta ciudad.

Toma de muestras

Para la detección de parásitos en las muestras provenientes de FS, se tomaron volúmenes de 20L en botellas de polipropileno estériles desinfectadas (7). En el caso de las muestras provenientes del SMS, estas fueron colectadas, mediante una bomba de succión por la cual se pasaron 1000 L de agua a través de un filtro tipo cartucho de polipropileno de 1 m de porosidad nominal (CUNO- CT 06450 Meriden, USA) manteniendo una velocidad de flujo entre 12 y 14 L/min. Una vez que se filtró el volumen de agua requerida, se extrajo el filtro y se colocó en una bolsa con cierre hermético.

Para la determinación de los indicadores bacterianos, se emplearon botellas de vidrio de 500 mL de capacidad, previamente esterilizadas que contenían tiosulfato de sodio a una concentración de 18 mg/L cuando la muestra que iba a ser procesada contenía cloro (8).

Todas las muestras se colocaron en una cava con hielo y se trasladaron al laboratorio para su inmediato procesamiento.

Estudio parasitológico

Las muestras de agua provenientes de FS fueron procesadas empleando las técnicas de floculación con carbonato de calcio (7) y formol-éter (9).

En la técnica de floculación con carbonato de calcio a 10 L de muestra se le agregó 100 mL de solución de Cloruro de Calcio 1M y 10 mL de Carbonato de Sodio 1M, se ajustó el pH a 10 y se dejó en reposo durante 24 horas, luego de las cuales se procedió a eliminar el sobrenadante por succión dejando un sedimento de aproximadamente 200 mL. Al

sedimento recuperado se le agregó 100 mL de una solución de ácido sulfámico al 10% agitando constantemente, la mezcla obtenida se centrifugó a 1.050 x g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue tratado con 100 mL de Buffer fosfato salino (PBS) estéril 1X; esta mezcla se centrifugó nuevamente bajo las condiciones anteriormente mencionadas y el sobrenadante se guardó a 4°C hasta su visualización (7).

El procedimiento para la determinación de parásitos por la técnica de formol éter se llevó a cabo dejando sedimentar 24h los 10 L de muestra, luego de lo cual se eliminó el sobrenadante por succión, recuperando aproximadamente 200 mL de sedimento, el cual fue lavado por centrifugación a 1050 x g por 10 minutos. Al sedimento recuperado se le agregó 10 mL de solución de formaldehído al 10% y se vortmerizó durante 3 minutos, luego de los cuales se agregó 10 mL de éter dietílico y se centrifugó la mezcla a 1050 x g por 10 minutos, posteriormente se procedió a eliminar las fases de solvente orgánico ubicados por encima del sedimento y éste fue guardado a -4°C hasta su visualización (9).

Para la detección de parásitos en las muestras del SMS se hicieron cortes longitudinales a las fibras del filtro de cartucho con un bisturí, y se separaron completamente todas las fibras del eje central del filtro. Se transfirió este material a un envase de plástico que contenía 4 L de solución eluente (solución salina amortiguadora 0,025 M pH 7,4 con 1% de Tween 80 y 1% de Sodio Dodesil Sulfato). El envase se agitó fuertemente durante 10 min. y se le añadió dos gotas de solución antiespumante (Antifoam A, Sigma, San Louis, MO.USA). Se descartaron las fibras y se centrifugó el eluente a 1.050 Xg por 15 min., se recolectó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 20 mL de solución de dicromato de potasio al 5% y se guardó a 4°C hasta su visualización (8).

La visualización y cuantificación de los parásitos protozoarios entéricos se realizó de la siguiente manera: examen al fresco con

solución salina fisiológica al 0,85% y coloración temporal con lugol para la observación de *Giardia* sp; coloración de Kinyoun (10) para la observación de *Cryptosporidium* sp, e Inmunofluorescencia directa (Waterboinc, INC) para la cuantificación de las especies de *G. lamblia* y *C. parvum*.

La técnica de Inmunofluorescencia directa se llevó a cabo empleando los anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína: A300FL Giardi-a-Glo™ (Waterboinc, INC) para la determinación de *G. lamblia*, y A400FL Crypto-a-Glo™ (Waterboinc, INC) para la de *C. parvum*. Cinco mililitros de cada muestra fueron pasados a través de filtros de membrana de policarbonato de 13 mm de diámetro, con un tamaño de poro de 5 µm para la enumeración de los quistes de *G. lamblia* y de 1,2 µm para los ooquistes de *C. parvum*. Una vez filtradas las muestras se agregó sobre el filtro 30 µl del anticuerpo respectivo y se incubó en oscuridad el filtro a temperatura ambiente durante 30 min., posteriormente se lavó el exceso de fluorocromo con buffer fosfato salino y se montó en portaobjetos para la visualización al microscopio de inmunofluorescencia (Zeiss, West Germany): a través de un filtro de luz azul (480 nm de excitación y 530 nm de emisión), empleando una magnificación de 400 X. Los parásitos estudiados se observaron como estructuras con fluorescencia verde manzana brillante. Los quistes de *G. lamblia* de forma oval de 8 a 12 µm de diámetro y los ooquistes de *C. parvum* como estructuras redondeadas de 4 a 6 µm.

La Concentración de quistes de *G. lamblia* y ooquistes de *C. parvum* se reportó en número de quistes y ooquistes por 100 L de muestra colectada, tomando en cuenta la fórmula que se presenta a continuación:

$$N = n \times S \times D / P \times V$$

Donde:

N= Número de quistes u ooquistes en el volumen de muestra analizada.

n= Número promedio de quistes u ooquistes por campo luego de contar mas de 30 campos diferentes seleccionados al azar.

S= área de la superficie del filtro.

D= Factor de dilución.

P= Area del campo.

V= Volumen de muestra filtrada.

Las muestras se procesaron junto con controles negativos de buffer fosfato salino estéril y controles positivos de muestras de heces humanas y animales, con el fin de determinar que no ocurrió contaminación durante el procesamiento, que las soluciones se encontraban libres de contaminación con parásitos y que los anticuerpos estaban funcionando correctamente.

Estudio de los indicadores bacterianos

El análisis de la presencia de los indicadores bacterianos se llevó a cabo siguiendo los procedimientos: 9222 para Coliformes totales y termotolerantes y 9215 para mesófilos aerobios, utilizando filtros de membrana de ésteres de celulosa (GN-6 Metrice™, Gelman Sciences) de 0,45 µm de diámetro del poro (8).

Los filtros fueron transferidos a placas estériles que contenían medio agar plate-count para la detección y cuantificación de los organismos mesófilos aerobios y M-Endo LES (DIFCO. MD, USA) para la de los coliformes totales, luego fueron incubados a 37°C ± 0,2°C durante 22 horas. La detección de los coliformes termotolerantes se llevó a cabo en medio mFC (BBL. MD, USA) incubando a 45 ± 0,2°C.

Resultados y Discusión

Se detectó mediante la técnica de inmunofluorescencia 14 (26) 53,8% de positividad para la presencia de *G. lamblia*, con un rango entre 2 y 75 quistes/100L y una media geométrica de 24 quistes/100L y 20 (26) 77% para presencia de *C. parvum*, en un

rango entre 1 y 75 ooquistes/100L con una media geométrica de 21 ooquistes/100 L (Tabla 1).

En las muestras de FS, el porcentaje de ocurrencia de los parásitos fue de 7 (16) 43,75% para la presencia de quistes de *G. lamblia*, con un rango entre 18 y 75 quistes/100L y un promedio de 45 quistes/100L, mientras que los ooquistes de *C. parvum* estuvieron presentes en 11 (16) 69% de las muestras, en un rango entre 18 y 75 ooquistes/100L y una media geométrica de 39 ooquistes/100 L. En las muestras del SMS se detectaron quistes de *G. lamblia* en 7 (10) 70%, con un rango entre 2 y 5 quistes/100 L y un promedio de 3 quistes/100L. En el caso de *C. parvum*, se detectaron ooquistes en el 9 (10) 90% de las muestras con concentraciones que fluctuaron entre 1 y 8 ooquistes/100L y una media geométrica de 4 ooquistes/100L (Tabla 1).

En base a los resultados obtenidos del análisis parasitológico de las muestras de agua provenientes de ambas fuentes, se

puede concluir que 20 (26) 77% de las muestras incumple con los requerimientos previstos en la normativa Venezolana para la calidad del agua potable (11), ya que esta estipula que el agua debe estar libre de parásitos. Por lo tanto, desde el punto de vista parasitológico estas aguas no eran aptas para el consumo humano.

Las concentraciones de quistes de *G. lamblia* obtenidas en los dos tipos de fuentes analizadas se encontró dentro del rango de 2-45/100 L, que es similar a la concentración que ha sido reportada durante brotes epidémicos causados por este protozooario en otros países (12,13). La cantidad de ooquistes de *C. parvum* detectados en las muestras de FS estuvo dentro del rango conocido como nivel de acción o nivel de riesgo (14).

Los porcentajes de ocurrencia y las concentraciones detectadas de quistes de *G. lamblia* y ooquistes de *C. parvum* en este estudio resultan preocupantes, tomado en consideración el tiempo de supervivencia en el agua de estos protozoarios, que es de 3

Tabla 1
Análisis Microbiológico de las muestras de agua

Tipo de Muestra	Análisis bacteriológico			Análisis Parasitológico	
	Het UFC/100 mL	CT UFC/100 mL	CTT UFC/100 mL	<i>G. lamblia</i> Quistes /100L	<i>C. parvum</i> Ooquistes /100L
Subterránea					
Muestras que presentaron	16 (16)	14 (16)	11 (16)	7 (16)	11(16)
Rango	12 - 300	6 - 270	1 - 118	18 - 75	18 - 75
Media geométrica*	139	73	25	45	39
SMS					
Muestras que presentaron	10 (10)	10 (10)	6 (10)	7 (10)	9 (10)
Rango	16 - 246	5 - 212	13- 88	2- 5	1-8
Media geométrica *	69	57	32	3	4

*Valor calculado sin incluir las muestras negativas. Het, heterótrofos; CT, coliformes totales; CTT coliformes termotolerantes.

meses para *Giardia* y 1 año en el caso de *Cryptosporidium* (14) las bajas dosis infecciosas de estos protozoarios y su resistencia a los procesos de coloración (15).

En un estudio previo realizado en 1998 el estado Zulia en el cual se determinó la presencia de los protozoarios *G. lamblia* y *C. parvum* en muestras de agua potable colectadas a la salida de la planta de tratamiento Alonso de Ojeda, se reportó la presencia de *G. lamblia* en el 27,7% de las muestras con una media geométrica de 1,89 quistes/100L y de *C. parvum* en el 90% de las muestras con una media geométrica de 5,32 ooquistes/100L (16). Si se comparan los anteriores valores con los obtenidos en esta investigación, se observa que hubo un aumento de 2,52 veces en la ocurrencia y 1,74 veces en la concentración de los quistes de *G. lamblia*, mientras que en el caso de *C. parvum* los porcentajes de ocurrencia y niveles de concentración han permanecido constantes a través del tiempo.

En esta investigación se determinó la presencia simultánea de *G. lamblia* y *C. parvum* en 14 del total de muestras estudiadas, la ausencia de ambos parásitos en 6 muestras y la presencia de *C. parvum* y la ausencia de *G. lamblia* también en 6 muestras. El hecho de que los ooquistes de *C. parvum* se detectaran en un mayor porcentaje de muestras indica que este protozoario es tan resistente como *G. lamblia*. Estos resultados concuerdan con los reportados en diversas investigaciones en las que se ha propuesto el uso de *C. parvum* como organismo indicador para la realización de estudios de estimación de riesgos de infección de las aguas (15).

Cuando se comparan los resultados obtenidos por las dos técnicas empleadas para la concentración de parásitos en las muestras de FS, se observa que se detectaron quistes de *G. lamblia* y ooquistes de *C. parvum* en el 68,7% de las muestras procesadas por la técnica de carbonato de calcio, mientras que estas, resultaron negativas

para ambos protozoarios al ser procesadas por la técnica de formol éter. Estos resultados indican que a pesar de que en diversos trabajos realizados en muestras de aguas residuales se ha comprobado la efectividad de la técnica de formol eter para la detección de protozoarios, esta técnica no es apropiada para la detección de la presencia de estos protozoarios en agua potable. Tomando en consideración los anteriores resultados y el hecho de que la técnica de carbonato de calcio puede ser realizada con bajos costos en reactivos y consumibles, se recomienda su aplicación como técnica de rutina para la determinación de la presencia de los protozoarios *Giardia* sp y *Cryptosporidium* sp en muestras de agua potable.

En cuanto a las técnicas empeladas para la visualización de las estructuras parasitarias, es de hacer notar que mediante inmunofluorescencia se observaron quistes de *G. lamblia* y ooquistes de *C. parvum*, tanto en las muestras provenientes de FS como en las del SMS, mientras que mediante el examen al fresco, la coloración temporal con lugol y Kinyoun no fue posible observar estos parásitos. Tomando en consideración que se analizaron muestras de agua potable, las diferencias observadas en los resultados de visualización de los protozoarios pueden explicarse principalmente como consecuencia del pequeño volumen de muestra (30 μ l) que se analiza a través de las técnicas anteriormente mencionadas, frente a 5 mL que se usaron en la técnica de inmunofluorescencia, ya que se ha calculado que a través de las técnicas de tinción tradicionales es necesario contar con concentraciones mayores de 1×10^4 /100L quistes u ooquistes en la muestra para poder detectar al menos uno en 30 μ L (17).

El análisis bacteriológico de los organismos indicadores de contaminación indicó la presencia de organismos heterótrofos en el 100% de las muestras estudiadas, con valores en un rango entre 12-300 UFC/100 mL con una media geométrica de 104 UFC/100 mL, los coliformes totales estuvieron presen-

tes en el 92,3%, con valores entre 5-270 UFC/100 mL y una media geométrica de 93,2 UFC/100 mL y los coliformes termotolerantes en el 62,38% del total de muestras analizadas con un rango entre 1-188 UFC/100 mL y una media geométrica de 20,8 UFC/100 mL.

Los resultados obtenidos del análisis de frecuencia de la presencia/ausencia de CT- *G. lamblia* y CT- *C. parvum* (Tabla 2), indican que del total de muestras analizadas, en 14 se detectó la presencia de CT y parásitos simultáneamente, y en dos muestras, en las que los CT no estaban presentes si se detectaron parásitos. Esto indica que no existe una correlación entre las concentraciones de heterótrofos, coliformes totales o coliformes fecales y la concentración de *G. lamblia* o *C. parvum* en las muestras estudiadas.

Al analizar la data obtenida en este estudio se observa que el agua potable libre de coliformes no está necesariamente libre de parásitos. A pesar del limitado número de muestras procesadas en este estudio, los resultados obtenidos coinciden con los presentados en otras investigaciones a nivel mundial en las cuales se ha comprobado que el grupo de bacterias coliformes no es un buen indicador de la presencia o ausencia de parásitos de origen fecal (12-14, 16-18).

La capacidad que tienen los protozoarios *Giardia* y *Cryptosporidium* de infectar una amplia diversidad de animales domésticos, aumenta las posibilidades de conta-

minación de las fuentes de agua superficiales y subterráneas con estos dos enteropatógenos. El ganado vacuno, especialmente los animales jóvenes, son uno de los principales reservorios de ooquistes de *Cryptosporidium* (16). Esto es de importancia ya que El Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables de Venezuela desde hace ya varios años ha reportado que en las inmediaciones de los embalses, así como en la cercanía de los pozos de extracción de agua subterránea que son utilizados como fuentes de abastecimiento existen asentamientos humanos donde se llevan acabo explotaciones pecuarias de ganado bovino y porcino, así como la cría de animales de granja (16). La descarga directa de las excretas de estos animales a estas fuentes, representa una fuente de contaminación del agua con estos parásitos (6)

Teniendo en cuenta lo anterior, el control de la presencia de microorganismos patógenos del agua no solo dependerá de la efectividad de los procesos de tratamiento y/o desinfección, sino también y principalmente de la protección de las fuentes de abastecimiento de agua. Por lo tanto, para lograr la eliminación de los patógenos del agua es necesario el establecimiento de un sistema de múltiples barreras, en el que se incluya la protección de las fuentes de agua potable tanto superficiales como subterráneas, la optimización de los procesos de tratamiento, el adecuado mantenimiento de los sistemas de distribución y la aplicación de

Tabla 2
Relación entre la presencia/ausencia de coliformes totales y parásitos.

Tipo de muestra	No. de muestras	No. de muestras conteniendo	
		<i>G. lamblia</i>	<i>C. parvum</i>
Positivas para CT	24 (26)	13 (24)	18 (24)
Negativas para CT	2 (26)	1 (2)	2 (2)

CT, coliformes totales.

un sistema de monitorio continuo de la presencia de estos protozoarios (15).

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el agua potable consumida en la ciudad de Maracaibo durante los meses de estudio presentaban un alto nivel de contaminación con quistes de *G. lamblia* y ooquistes de *C. parvum*.

Los indicadores bacteriológicos utilizados rutinariamente para evaluar la calidad sanitaria del agua potable en Venezuela, no son adecuados para predecir la calidad parasitológica de estas.

Agradecimiento

Este trabajo de Investigación fue posible gracias al apoyo financiero otorgado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) y el apoyo logístico de la División de Investigación de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia. Nuestros agradecimientos también al personal del laboratorio de Calidad de Aguas del Ministerio de Salud y Desarrollo Social del Estado Zulia por brindarnos todas las facilidades para la toma de muestras.

Referencias Bibliográficas

1. REYNOLDS K. *Agua Latinoamérica*. Marzo / Abril, 2004.
2. COULIETE A., HUFFMAN D., SLIFKO T., ROSE J. *J Parasitol* 92(1): 58-62, 2006.
3. MINVIELLE M., PEZZANI B., CORDOBA M., DE LUCA M., APEZTEGUIA M., BAUSALDO J. *Korean J Parasitol* 42(3): 121-127, 2004.
4. MILLER SA., ROSARIO CL., ROJAS E., SCORZA JV. *Trop Med Int Health* 8: 346-347, 2003.
5. CHACIN-BONILLA L., BONILLA M.C., SOTO-TORRES L., RIOS-CANIDIDA Y., SARDINA M., ENMANUELS C., PARRA A.M., SANCHEZ-CHAVEZ Y. *Am J Trop Med Hyg* 56(4):365-9, 1997.
6. BETANCOURT W., ROSE J. *Veterinary Parasitology* 126:219-234, 2004.
7. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S.-EPA). Information collection rule microbial laboratory manual. Publication EPA/600/R-95/178. Washington DC (USA), 1998.
8. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater, Washington DC (USA), 2000.
9. RITCHIE L. *Bull US Army Med Dept* 8: 326-330, 1948.
10. FORBES B., SAHM D., WEISSFEL A. *Diagnostic Microbiolog*, Mosby, ST. Luis Missouri (USA), p. 862-863, 1998.
11. GACETA OFICIAL DE LA REPUBLICA DE VENEZUELA N° 36395. Normas sanitarias de calidad de agua potable de 1998.
12. KISTEMANN T., GLABEN T., KOCH C., DANGENDORF F., FISHER R., GEBEL J., VACATA V., EXNER M. *Appl Environ Microbiol* 68(5): 2188-2197, 2002.
13. LE CHAVELIER M., WELCH N., SMITH D. *Appl Environ Microbiol* 62(7): 2201-2211, 1996.
14. ROSE J., LISLE J., HASS C. *Modeling disease transmission and its prevention by disinfection* Cambridge University Press, USA. p 75-98, 1996.
15. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S.-EPA). Proposed Rules. *Fed Regist*; 65(91):30193-30274, 2000.
16. BOTERO L., QUINTERO W. *Ciencia* 6(2):100-111, 1998.
17. BING-MU H., HSUAN-HSIEN Y. *Water Research* 37: 1111-1117, 2003.
18. HARWOOD V., LEVINE A., SCOTT T., CHIVUKULA V., LUKASIK J., FARRAH S., ROSE J. *Appl Env Microbiol* 71(6): 3163-3170, 2005.