

Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água destinada a manutenção dos peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) em cativeiro

João Carlos Gomes Borges^{1*}
Leucio Câmara Alves²
Maria Aparecida da Gloria Faustino²
Jeane Kury Nobre Gomes³
Régis Pinto de Lima⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária – UFRPE

²Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos – UFRPE

³Fundação Mamíferos Aquáticos

⁴Centro Mamíferos Aquáticos/IBAMA

*Autor para correspondência

R. Manoel Andrade, 2460, Coroa do Meio, CEP 49035-530, Aracaju – SE, Brasil

jcgborges@hotmail.com

Submetido em 29/03/2007

Aceito para publicação em 05/07/2007

Resumo

A finalidade da pesquisa foi verificar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água de consumo e abastecimento das piscinas destinadas aos peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) em cativeiro. Para tanto, foram coletadas seis amostras de água, provenientes do ponto de abastecimento das piscinas (praia), água destinada ao consumo dos animais, água mineral utilizada na formulação da dieta láctea ofertada aos filhotes órfãos e das piscinas destinadas a manutenção permanente, reabilitação com filhotes de idade superior a dois anos e reabilitação com filhotes de idade inferior a dois anos. Antes das amostras serem processadas, estas foram submetidas ao processo de filtração. Posteriormente o diagnóstico do parasito foi realizado pela técnica de Kinyoun e as amostras positivas foram submetidas ao Teste de Imunofluorescência Direta. Os resultados revelaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 66,67% (4/6) das amostras, correspondendo à água proveniente do ponto de abastecimento dos recintos e das piscinas, sendo encontrados de oito a 56 oocistos/litro. Os resultados evidenciaram que a água destinada à manutenção dos peixes-boi marinhos pode ser um meio importante na transmissão hídrica de *Cryptosporidium* spp. predispondo a ocorrência da criptosporidiose em peixes-boi marinhos em cativeiro.

Unitermos: *Trichechus manatus*, epidemiologia, criptosporidiose, saúde pública

Abstract

Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in the maintenance water of Antillean manatees (*Trichechus manatus*) in captivity. The goal of this research was to verify the occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in the water consumption and supply of pools used by Antillean manatee (*Trichechus manatus*) in captivity. Six samples were collected from the pool's supply system (at the beach), water used for manatee consumption, mineral water used in the preparation of artificial milk formulas offered to orphan manatee calves, also used in

permanent maintenance pools in the visitation area, and water utilized in the rehabilitation area, where calves of all ages were kept. Before the water samples were processed, each sample was submitted to a filtration process. The diagnosis of the parasite was obtained by Kinyoun technique and the positive samples were submitted to the Direct Immunofluorescence Test. The results showed the presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in 66.67% (4/6) of the samples from the water supply system and pool, with eight to 56 oocysts per liter. There was evidence that the water used in the maintenance of the Antillean manatees could be an important medium for hydric transmission of *Cryptosporidium* spp. and that it may be a predisposing factor to the occurrence of cryptosporidiosis in Antillean manatees in captivity.

Key word: *Trichechus manatus*, epidemiology, cryptosporidiosis, public health

Introdução

O *Cryptosporidium* spp. é considerado um protozoário oportunista, que acomete uma ampla variedade de animais e o homem (Gómes et al., 1996; Xiao et al., 1998; Matsubayashi et al., 2005), podendo provocar quadros de diarreia aquosa, perda de peso e dores abdominais (Hill et al., 1997; Baraldi et al., 1999; Borges et al., 2005).

A contaminação dos recursos hídricos proveniente dos resíduos agropecuários, industriais e domésticos (LeChevallier et al., 1991; Smith, 1993) por este coccídio vem despertando atenção em diversos países, seja em águas superficiais bruta ou tratada (LeChevallier et al., 1991; Ward et al., 2002; Gomes et al., 2002; Luna et al., 2002; Heller et al., 2004), água mineral (Franco e Cantusio Neto, 2002), em poços artesianos (Gamba et al., 2000), esgotos tratados ou não (Smith, 1998; Farias et al., 2002), águas marinhas e estuarinas (Fayer, 2004). Além disso, a sobrevivência dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., em diversas condições ambientais por longos períodos, aliado à capacidade de resistir aos mais variados métodos usados em tratamento de água, vem favorecer sua disseminação (Korich et al., 1990; Robertson et al., 1992; Fayer, 1997; Rose, 1998; Fayer, 2004).

Desta forma, esta pressão sobre os recursos hídricos tem acarretado a contaminação de diversos organismos aquáticos por oocistos de *Cryptosporidium* spp., tais como ostras (Gómes-Couso et al., 2003; Fayer et al., 2003), peixes (Alvarez-Pellitero e Sitjá-Bobadilla, 2002), tartarugas marinhas (Graczyk et al., 1997) e ainda na infecção de algumas espécies de mamíferos aquáticos (Morgan et al., 2000; Hughes-Hanks et al., 2005), incluindo o peixe-boi marinho (Borges et al., 2005).

Em mamíferos aquáticos, a veiculação hídrica foi apontada como um possível meio de disseminação do agente, como nos casos de infecções em focas-aneladas (*Phoca hispida*), baleia da Groenlândia (*Balaena mysticetus*) e baleia-franca do norte (*Eubalaena glacialis*), conforme descrito por Hughes-Hanks et al. (2005)

Portanto, a ocorrência deste coccídio em peixes-boi marinhos cativos, surge como fator de preocupação, mediante a possibilidade de disseminação dos oocistos, haja visto que a água contaminada pode rapidamente atingir um grande número de hospedeiros susceptíveis.

Neste trabalho teve-se por objetivo avaliar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água de consumo e abastecimento das piscinas dos peixes-boi marinhos cativos no Centro Mamíferos Aquáticos/IBAMA.

Material e Métodos

Coleta de água para pesquisa de *Cryptosporidium*

Foram coletadas amostras de água superficial, em galões de cinco litros, provenientes do ponto de abastecimento das piscinas (área marinha costeira situada nas imediações das piscinas), da água ofertada aos animais (proveniente do abastecimento público), água mineral utilizada na formulação da dieta láctea ofertada aos filhotes órfãos e água das piscinas destinadas a manutenção permanente, reabilitação com filhotes de idade superior a dois anos e reabilitação com filhotes de idade inferior a dois anos (Figura 1), nas instalações do Centro Mamíferos Aquáticos/IBAMA, localizado na Ilha de Itamaracá (7°44'52"S; 34°49'32"W), Estado de

Pernambuco – Brasil. Apenas a primeira amostra tratava-se de água bruta, sendo as demais águas tratadas. Além desta observação, é válido destacar que as coletas de água foram realizadas antes das piscinas serem liberadas para a permanência dos animais e após todo o tratamento físico-químico executado.

Todas as amostras foram identificadas e encaminhadas para a análise no Departamento de Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco.

Processamento laboratorial das amostras de água

As amostras foram filtradas por pressão negativa usando membrana de ésteres de celulose (47mm de diâmetro e 3µm de porosidade). Para a concentração dos oocistos foi usado o método descrito por Aldom e Chagla (1995), com modificação na etapa de dissolução da membrana em acetona, sendo utilizado a sua eluição com solução contendo Dodecil Sulfato de Sódio (1%) e

Tween 80 (1%) e auxílio de uma espátula plástica para raspagem da superfície da membrana (Franco et al., 2001).

A partir do volume resultante, sucessivas centrifugações foram realizadas com álcool 95% e 70%, de modo a ressuspender os sedimentos. Em seguida duas alíquotas de 5µL do sedimento final foram colocadas em lâminas para microscopia e destinadas a pesquisa de *Cryptosporidium* spp., sendo utilizado o método de coloração Kinyoun (Brasil, 1996), seguido do teste de imunofluorescência direta (IFD) conforme recomendações do fabricante do Kit Merifluor® (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio).

A identificação dos oocistos, nas preparações com coloração de Kinyoun foram aquelas descritas por Lima et al. (2004), enquanto que na análise de imunofluorescência direta, consideraram-se as estruturas com tamanho e formato compatíveis, na cor verde-maçã, com ou sem estruturas exibindo fluorescência, conforme as orientações de Sterling e Arrowood (1986).



FIGURA 1: Local de captação de água para abastecimento das piscinas (1); piscinas de manutenção permanente (2); piscinas de reabilitação (3). Fonte: Falcão, G/FMA.

Análise de Parâmetros Físico-Químicos e Microbiológicos

Duas vezes ao dia foram realizadas análises físico-químicas em todas as piscinas, o que possibilitou o monitoramento dos parâmetros de temperatura, salinidade, transparência, cloro residual, pH e oxigênio dissolvido. Estes mesmos parâmetros foram empregados em uma avaliação prévia na água de abastecimento (praia), não sendo executado na água destinada ao consumo dos animais (provenientes do abastecimento público e mineral).

Na determinação da transparência, foi utilizado o método clássico do disco de Secchi, medindo cerca de 15cm de raio, na cor branca e atrelado a uma corda graduada a cada 10cm, enquanto que para a determinação do cloro residual foram utilizados testes colorimétricos. Os demais parâmetros mencionados foram aferidos pelo Analisador Multi-Parâmetro (portátil, marca WTW® modelo Multi 340i), sendo este um equipamento digital de alta precisão.

Além destes parâmetros analisados, foram realizadas semanalmente análises de coliformes fecais, a partir de amostras devidamente coletadas em frascos apropriados, acondicionados em caixa de isopor, mantidos sob refrigeração e transportadas ao Laboratório de Análises da Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Estado de Pernambuco (CPRH).

Os valores encontrados foram comparados aos recomendados pela Instrução Normativa (Brasil, 2002), em seu capítulo que rege sobre os parâmetros inerentes à qualidade de água.

Resultados e Discussão

Foi observado pelo método de Kinyoun e confirmado pelo teste de imunofluorescência direta (IFD), oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 66,67% (4/6) das amostras analisadas provenientes do ponto de abastecimento das piscinas (AP) e das piscinas de manutenção permanente (PMP), reabilitação de filhotes com idade superior a dois anos (PRF>2) e reabilitação de filhotes com idade inferior a dois anos (PRF<2), sendo encontrados de oito a 56 oocistos/litro. Nas amostras inerentes a água ofertada

ao consumo (AC) e água mineral utilizada na dieta láctea dos filhotes (AM) não foi encontrada nenhuma estrutura sugestiva de oocistos deste coccídio (Tabela 1).

Os dois métodos utilizados na identificação de *Cryptosporidium* spp. apresentaram sensibilidade e confiabilidade nos resultados encontrados. De acordo com Smith (1998), diferentes métodos de diagnóstico têm sido desenvolvidos para a detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água, cada qual com suas vantagens e desvantagens, porém ainda não há um método universalmente aceito.

A presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ponto de captação (praia) de água de abastecimento representa o primeiro relato deste coccídio em águas marinhas costeiras no Brasil, sugerindo o maior comprometimento dos recursos hídricos por este organismo, que até então somente havia sido descrito em rios (Machado, 2006), estações de tratamento, reservatórios destinados ao abastecimento público (Muller, 1999; Heller et al., 2004) e águas de poços (Gamba et al., 2000). O comprometimento dos ambientes marinhos e estuarinos por este agente tem sido manifestado como fator de preocupação em diversos países (LeChevallier et al., 1991; Ferguson et al., 1996; Fayer et al., 2002).

TABELA 1: Diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. de acordo com o teste utilizado.

Amostras	Método de Kinyoun	Teste de IFD
AP	Presença	Presença
PMP	Presença	Presença
PRF>2	Presença	Presença
PRF<2	Presença	Presença
AC	Ausência	Ausência
AM	Ausência	Ausência

IFD (imunofluorescência direta); AP (Ponto de abastecimento das piscinas); PMP (Piscina de manutenção permanente); PRF>2 (Piscina de reabilitação de filhotes com idade superior a dois anos); PRF<2 (Piscina de reabilitação de filhotes com idade inferior a dois anos); AC (água de consumo); AM (Água mineral).

Em observações preliminares do local destinado ao abastecimento das piscinas e imediações, aponta-se a proximidade de estuários, os quais recebem uma grande descarga de dejetos fecais provenientes de humanos e animais, os resíduos industriais e as atividades de

despesca relacionadas à carcinocultura, constituindo assim alguns dos fatores que podem ter acarretado a contaminação deste manancial.

Por sua vez, a presença de oocistos deste coccídio em águas das piscinas, aqui observadas, as quais anteriormente foram submetidas ao tratamento físico-químico, salienta as limitações dos métodos utilizados para a inativação do agente, o que também já foi constatado em águas tratadas destinadas ao uso público (LeChevallier et al., 1991; Muller, 1999; Heller et al., 2004), e de parques aquáticos (Causer et al., 2006). O reduzido tamanho deste parasito, aliado à sua resistência aos desinfetantes comumente utilizados, tem sido apontado como fator que favorece sua passagem nos processos de filtração (LeChevallier et al., 1991; Fayer, 1997).

A desinfecção através do cloro nas concentrações comumente utilizadas nos tratamentos convencionais de água não é efetiva para a inativação de *Cryptosporidium* (Rose, 1998), conforme demonstrado por Campbell et al. (1982) ao mencionar sua capacidade de manter-se viável quando exposto àquele produto químico.

Sendo assim, fica evidente a vulnerabilidade dos peixes-boi marinhos em cativeiro, uma vez que a presença de algum animal infectado poderá constituir um risco ainda maior na disseminação dos oocistos para

outros espécimes cativos, favorecidos desta forma pela veiculação hídrica.

No que concerne aos resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos (Tabela 2), com base na média dos valores encontrados, apenas a temperatura e a presença de coliformes fecais apresentaram-se em desconformidade aos critérios previamente estabelecidos à Instrução Normativa (Brasil, 2002), em seu capítulo que apresenta as regulamentações para a qualidade de água.

Os resultados apresentados demonstram que, mesmo havendo concordância em grande parte dos valores obtidos em relação aos de referência, o tratamento não foi suficiente para promover a inativação e/ou remoção dos oocistos. Essa capacidade dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. adaptar-se as diferentes variações ambientais foi demonstrada em estudos de laboratório, ao serem submetidos a diversas temperaturas (Fayer et al., 1998) e salinidade (Freire-Santos et al., 1999).

Por outro lado, a alta densidade de animais nas piscinas de manutenção permanente, explica os níveis elevados de coliformes fecais, sendo este utilizado em alguns estudos como parâmetro importante de correlação positiva com a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. (LeChevallier et al., 1991). De maneira semelhante, a

TABELA 2: Valores encontrados de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e resultados das análises físico-químicas e microbiológicas realizadas nas amostras de água.

Amostr a	Nº de oocis tos/l	Parâmetros Analisados						
		T (°C)	Sal (ppt)	Secchi (cm)	Cl	pH	OD (mg/l)	CF (NMP)
AP	56	29,27	35	101,33	0,0	7,90	1,40	40
PMP	32	28,40	27,20	2,74	0,0	7,30	0,48	1356
PRF>2	24	28,30	27,60	1,39	0,0	7,29	0,56	5490
PRF<2	8	28,50	28,00	0,90	0,0	7,24	0,43	53
AC	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	13
AM	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IN	ND	10-28	20-36	ND	0.5	7,20-8,40	ND	250

T (Temperatura); Sal (Salinidade); Secchi (turbidez); Cl (Cloro); pH (potencial de hidrogênio iônico); OD (Oxigênio Dissolvido); CF (Coliformes Fecais); NA (Não Analisado); ND (Não Definido); AP (Ponto de abastecimento das piscinas); PMP (Piscina de manutenção permanente); PRF>2 (Piscina de reabilitação de filhotes com idade superior a dois anos); PRF<2 (Piscina de reabilitação de filhotes com idade inferior a dois anos); AC (água de consumo); AM (Água mineral); IN (Instrução Normativa).

turbidez também tem sido utilizada como indicador de previsibilidade, devido a facilidade de aderência dos oocistos a compostos orgânicos e inorgânicos (Medema et al., 1998). No entanto, em decorrência do reduzido número de amostras analisadas, não foi possível estabelecer uma correlação estatística entre a presença do parasito e os parâmetros analisados, o que torna oportuno a execução de novas avaliações.

Em parques aquáticos, algumas modificações importantes vêm sendo adotadas para evitar a transmissão de *Cryptosporidium* aos seus usuários, dentre estas a adequação no sistema de filtração e o seu monitoramento constante, a utilização de ozônio ou ainda a instalação de um sistema ultravioleta (Kanjo et al., 2000; Causer et al., 2006). Tais alternativas podem ser replicadas nas instalações destinadas a manutenção dos peixes-boi marinhos, de modo que a utilização de novas metodologias não venha a prejudicar a saúde dos animais presentes.

Além da adequação das instalações, no intuito de propiciar melhorias para a manutenção de mamíferos aquáticos em cativeiro no Brasil, sugere-se a complementação da Instrução Normativa (Brasil, 2002), em seu capítulo que roge sobre a qualidade da água, a partir da inclusão de diretrizes que determinem a realização de técnicas laboratoriais específicas para a pesquisa de *Cryptosporidium* spp., de forma semelhante às recomendações do Ministério da Saúde, no que diz respeito à potabilidade da água (Brasil, 2004).

Sendo assim, a veiculação hídrica de *Cryptosporidium* nas piscinas, além de representar uma preocupação em relação à infecção dos peixes-boi marinhos, também constitui como fator de risco para a infecção dos funcionários, sobretudo aqueles diretamente envolvidos na manutenção destas instalações e oferta de mamadeiras aos filhotes, tendo em vista a grande adaptação deste agente aos diferentes hospedeiros (Xiao et al., 2002). Além disto, a presença de oocistos no ponto de captação (praia) traz uma preocupação ainda maior, pois o local vem sendo utilizado com grande frequência para atividades recreativas, por banhistas de idades variadas, aumentando desta forma o contingente de pessoas em risco de infecção, representando assim um risco para a saúde pública.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Prof^ª Dr^ª Tânia Lucia Montenegro e Daniele Soares, do Departamento de Nutrição da UFPE, pela colaboração durante o processamento das amostras. Ao Dr. Jean Carlos Ramos da Silva, a Dr^ª Eriane Lima de Castro Machado e dois revisores anônimos pelos comentários no manuscrito. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE, à FACEPE e a Petrobras, através de patrocínio ao projeto Conservação de Matas Alagadas de Mamirauá. As atividades foram desenvolvidas mediante a Licença N° 011-05/CMA/IBAMA.

Referências

- Aldom, J. E.; Chagla, A. H. 1995. Recovery of *Cryptosporidium* spp. oocysts from water by a membrane filter dissolution method. **Letters in Applied Microbiology**, **20**: 186-187.
- Alvarez-Pellitero, P.; Sitjà-Bobadilla, A. 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International Journal for Parasitology**, **32**: 1007-1021.
- Baraldi, S. R.; Marques, E. G. L.; Dias, R. M. D. S. 1999. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na região de Campinas, SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, **58** (1): 97-103.
- Borges, J. C. G.; Lima, E. C.; Alves, L. C.; Vergara-Parente, J. E.; Faustino, M. A. G.; Lima, A. M. A.; Lima, R. P. 2005. *Cryptosporidium* spp. em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) cativo no Centro Mamíferos Aquáticos, Ilha de Itamaracá, no estado de Pernambuco. **Resumos do 1º Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária**, Guarapari, Brasil, p.35.
- Brasil. 1996. **Infecções oportunistas por parasitas em AIDS: técnicas de diagnóstico**. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil, 27pp.
- Brasil. 2002. **Instrução Normativa n. 3 de 08 de fevereiro de 2002**. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em 10 de janeiro de 2007.
- Brasil. 2004. **Portaria n. 518 de 25 de março de 2004**. Regulamenta os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, e da outras providências. Brasília, DF: MS/ANVISA, 2004. Disponível em <<http://www.uniagua.org.br>>. Acesso em 16 de março de 2007.
- Campbell, I.; Tzipori, S.; Hutchison, G. E.; Angus, K. W. 1982. Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. **The Veterinary Record**, **3**: 414-415.
- Causer, L. M.; Handzel, T.; Welch, P.; Carr, M.; Culp, D.; Lucht, R.; Mudahar, K.; Robinson, D.; Neavear, E.; Fenton, S.; Rose, C.; Craig, L.; Arrowood, M.; Wahlquist, S.; Xiao, L.; Lee, Y. M.; Mirel, L.; Levy, D.; Beach, M. J.; Poquette, G.; Dworkin, M. S. 2006. An outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection at an Illinois recreational waterpark. **Epidemiology and Infection**, **134**: 147-156.

- Farias, E. W. C.; Gamba, R. C.; Pellizri, V. H. 2002. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, **33** (1): 41-43.
- Fayer, R. 1997. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Raton, USA, 251pp.
- Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, **182**: 37-56.
- Fayer, R.; Trout, J. M.; Jenkins, M. C. 1998. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. **Journal of Parasitology**, **84**: 1165-1169.
- Fayer, R.; Trout, J. M.; Lewis, E. J.; Santim, M.; Zhou, L.; Lal, A. A.; Xiao, L. 2003. Contamination of Atlantic Coast Commercial Shellfish With *Cryptosporidium*. **Parasitology Research**, **89**: 141-145.
- Fayer, R.; Trout, J. M.; Lewis, E. J.; Xiao, L.; Lal, A.; Jenkins, M. C.; Graczyk, T. K. 2002. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. **Parasitology Research**, **88**: 998-1003.
- Ferguson, C. M.; Coote, B. G.; Ashbolt, N. J.; Stevenson, I. M. 1996. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. **Water Research**, **30** (9): 2045-2054.
- Franco, R. M. B.; Cantusio Neto, R. 2002. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **97**: 205-207.
- Franco, R. M. B.; Rocha-Eberhardt, R.; Cantusio Neto, R. 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* cysts in raw water from Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **43**: 109-111.
- Freire-Santos, F.; Oteiza-Lopes, A. M.; Vergara-Castiblanco, C. A.; Ares-Mazas, M. E. 1999. Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. **Veterinary Parasitology**, **87**: 1-7.
- Gamba, R. C.; Ciapina, E. M. P.; Batello, E. R.; Espíndola, R. S.; Silva, A. L. B.; Pacheco, A.; Pellizari, V. H. 2000. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, S. Paulo - Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, **31**: 151-153.
- Gomes, A. H. S.; Pacheco, M. A. S. R.; Fonseca, Y. S. K.; Cesar, N. P. A.; Dias, H. G. G.; Silva, R. P. 2002. Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em águas de fontes naturais e comparação com análises bacteriológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, **61** (1): 59-63.
- Gómes-Couso, H.; Freire-Santos, F.; Ortega-Inárrrea, M. R.; Castro-Hermida, J. A.; Ares-Mazás, M. E. 2003. Environmental dispersal of *Cryptosporidium parvum* oocysts and cross transmission in cultured bivalve molluscs. **Parasitology Research**, **90**: 140-142.
- Gómez, M. S.; Vila, T.; Feliu, C.; Montoliu, I.; Gracenea, M.; Fernandez, J. 1996. A survey for *Cryptosporidium* spp. in mammals at the Barcelona Zoo. **International Journal for Parasitology**, **26** (11): 1331-1333.
- Graczyk, T. K.; Balazs, G. H.; Work, T.; Aguirre, A. A.; Ellis, D. M.; Murakawa, S. K. K.; Morris, R. 1997. *Cryptosporidium* sp. infections in green turtles, *Chelonia mydas*, as a potential source of marine waterborne oocysts in the Hawaiian Islands. **Applied and Environmental Microbiology**, **63** (7): 2925-2927.
- Heller, L.; Bastos, R. R. X.; Vieira, M. B. C. M.; Bevilacqua, P. D.; Brito, L. L. A.; Mota, S. M. M.; Oliveira, A. A.; Machado, P. M.; Salvador, D. P.; Cardoso, A. B. 2004. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, **13** (2): 79-92.
- Hill, B. D.; Fraser, I. R.; Prior, H. C. 1997. *Cryptosporidium* infection in a dugong (*Dugong dugon*). **Australian Veterinary Journal**, **75** (9): 670-671.
- Hughes-Hanks, J. M.; Rickard, L. G.; Panuska, C.; Saucier, J. R.; O'Hara, T. M.; Dehn, L.; Rolland, M. 2005. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in five marine species. **Journal of Parasitology**, **91** (5): 1255-1228.
- Kanjo, Y.; Kimata, I.; Miyanaga, S.; Okada, H.; Banno, C.; Matsumoto, M.; Shimada, Y. 2000. Inactivation of *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by in vitro excystation and animal infectivity. **Water Science Technology**, **41**: 119-125.
- Korich, D. G.; Mead, J. R.; Madore, M. S.; Sinclair, N. A.; Sterling, C. R. 1990. Effect of azone, chlorine dioxide, chlorine and monochloroamine on *Cryptosporidium* oocysts viability. **Applied and Environmental Microbiology**, **56**: 1423-1428.
- LeChevallier, M. W.; Norton, W. D.; Lee, R. G. 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, **57** (9): 2610-2616.
- Lima, E. C.; Melo, V. S. P.; Brito, F. L. C.; Alves, L. C.; Stanford, T. L. M. 2004. Avaliação de diferentes técnicas de coloração histoquímica na identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água e leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, **11** (½): 21-26.
- Luna, S.; Reyes, L.; Chinchilla, M.; Catarinella, G. 2002. Presencia de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em aguas superficiales em Costa Rica. **Parasitologia Latinoamericana**, **57**: 63-65.
- Machado, E. C. L. 2006. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais na região metropolitana de Recife/PE**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 141pp.
- Matsubayashi, M.; Takami, K.; Kimata, I.; Nakanishi, T.; Tani, H.; Sasai, K.; Baba, E. 2005. Survey of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. infections in various animals at a zoo in Japan. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, **36** (2): 331-335.
- Medema, G. J.; Schets, F. M.; Teunis, P. F. M.; Havelar, H. 1998. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, **64** (11): 4460-4466.
- Morgan, U. M.; Xiao, L.; Hill, B. D.; O'Donoghue, P.; Josef Limor, A. L. A.; Andrew Thompson, R. C. 2000. Detection of the *Cryptosporidium parvum* "Human" genotype in a dugong (*Dugong dugon*). **Journal of Parasitology**, **86**: 1352-1354.
- Muller, A. N. B. 1999. **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 107pp.
- Robertson, L. J.; Campbell, A. T.; Smith, H. V. 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. **Applied and Environmental Microbiology**, **58**: 3494-3500.

- Rose, J. B. 1998. Occurrence and significance of *Cryptosporidium* in water. **Journal of the American Water Works Association**, **80**: 53-58.
- Smith, H. V. 1998. Detection of parasites in the environment. **Parasitology**, **117**: 113-141.
- Smith, J. L. 1993. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* as agents of foodborne disease. **Journal of Food Protection**, **56** (5): 451-461.
- Sterling, C. R.; Arrowood, M. J. 1986. Detection of *Cryptosporidium* sp. infections using a direct immunofluorescent assay. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, **5**: 139-142.
- Ward, P. I.; Deplazes, W.; Regli, W.; Rinder, H.; Mathis, A. 2002. Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and waste waters in Europe. **Parasitology**, **124**: 359-368.
- Xiao, L.; Sulaiman, I.; Fayer, R.; Lal, A. A. 1998. Species and Strain-specific Typing of *Cryptosporidium* Parasites in Clinical and Environmental Samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **93** (5): 687-692.
- Xiao, L.; Sulaiman, I. M.; Ryan, U. M.; Zhou, L.; Atwill, E. R.; Tischler, M. L.; Zhang, X.; Fayer, R.; Lal, A. A. 2002. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, **32**: 1773-1785.