DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. NA ÁGUA: OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO COLORIMÉTRICO

Letícia Beatriz de Lima[(1)]
Doutoranda em Engenharia Hidráulica e Saneamento na Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC-USP). Engenheira Civil e Mestra em Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais pela Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FEIS-Unesp).
Seila Couso-Perez[(2)]
Doutora em Parasitologia pela *Universidad de Santiago de Compostela* (Espanha). Pesquisadora no Centro de Nanotecnologia e Bioengenharia Integrada da *Ulster University* (Reino Unido). Professora assistente do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da *Universidad de Santiago de Compostela*.
Hipolito Gomez-Couso[(3)]
Doutor em Farmácia pela *Universidad de Santiago de Compostela* (Espanha). Professor associado do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da *Universidad de Santiago de Compostela*.
Lyda Patricia Sabogal-Paz[(4)]
Doutora em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC-USP). Professora titular do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP.
Pilar Fernandez-Ibanez[(5)]
Doutora em Física Aplicada pela *Universidad de Granada* (Espanha). Professora de Engenharia Ambiental na Escola de Engenharia da *Ulster University* (Reino Unido).

Endereço[(1)]**:** Rua Jacinto Favoreto, 394, Apartamento 54 - Jardim Lutfalla - São Carlos - São Paulo - CEP: 13560-515 - Brasil - Tel: +55 (17) 99606-6015 - e-mail: leticia.b.lima@usp.br

RESUMO

A contaminação dos corpos hídricos por microrganismos resistentes é um grande problema para a saúde pública. Os reagentes de alto custo e a longa duração das análises são fatores limitantes para o monitoramento contínuo de protozoários em sistemas de abastecimento de água. Este estudo buscou a otimização de um método de três etapas para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium*: concentração por centrifugação, isolamento por separação imunomagnética e detecção colorimétrica. Em amostras com concentração conhecida de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, foram testadas três diluições do reagente Estreptavidina-peroxidase (SA-HRP) (1:5000, 1:10000 e 1:15000) e três tempos de incubação com o substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (5, 10 e 15 minutos). Avaliou-se a combinação mais eficiente, equilibrando alta absorbância a 450 nm com a economia de reagentes e de tempo. Com o teste ANOVA, constatou-se que as variáveis analisadas provocam diferenças significativas na absorbância das amostras. Os resultados sugerem que a diluição 1:10000 do SA-HRP e o tempo de incubação de 10 minutos com o TMB resultaram na análise mais eficiente. A otimização desse método pode contribuir para a viabilização do monitoramento de *Cryptosporidium*, prevenindo assim a ocorrência de surtos infecciosos.

PALAVRAS-CHAVE: recursos hídricos, qualidade da água, aptâmeros.

INTRODUÇÃO

A contaminação microbiológica dos corpos hídricos representa um grande problema para a saúde pública, especialmente no Brasil, onde 47,8% do esgoto gerado não é tratado e parte é lançada diretamente em cursos d'água (Brasil, 2023). Entre os microrganismos de maior preocupação, os protozoários destacam-se por sua grande resistência a diversos processos de remoção e inativação (OMS, 2009), não sendo completamente eliminados nos sistemas convencionais de tratamento de água (Moussa *et al.*, 2023).

O *Cryptosporidium* é um protozoário parasita de veiculação hídrica causador da criptosporidiose, uma das principais doenças de transmissão fecal-oral associadas à mortalidade infantil (Khalil *et al.*, 2018). Este patógeno é encontrado no ambiente na condição de oocisto, sua forma infecciosa que necessita de um

hospedeiro para se multiplicar (OMS, 2009). Dos 416 surtos de protozoários de veiculação hídrica relatados entre 2017 e 2022 no mundo, o *Cryptosporidium* spp. foi responsável por 77,4%. (Bourli *et al.*, 2023).

No Brasil, a Portaria nº 888 do Ministério da Saúde exige o monitoramento de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos pontos de captação de sistemas de abastecimento de água que utilizam mananciais superficiais, mas apenas em condições específicas: quando a média da concentração de *Escherichia coli* das últimas 12 amostragens mensais for ≥ 1000 UFC/100 mL e a média da eficiência de remoção de esporos de bactérias aeróbias das últimas 4 amostragens semanais for < 2,5 log (99,7%). Nesse caso, devem ser feitas análises mensais por pelo menos um ano (Brasil, 2021).

Um dos motivos para o monitoramento de *Cryptosporidium* ocorrer em situações tão características, é por sua análise ser muito onerosa e complexa, sendo priorizados indicadores microbiológicos de análises mais acessíveis, como *E. coli* e esporos de bactérias aeróbias (USEPA, 2010; Headd; Bradford, 2016). Entretanto, nem sempre há uma correlação entre a ocorrência desses organismos e dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Nieminski *et al.*, 2010), ainda sendo indispensável a análise de protozoários para a prevenção de surtos infecciosos.

A análise de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras ambientais geralmente é feita em três etapas: i) concentração dos organismos na amostra (por filtração ou centrifugação); ii) isolamento dos organismos do concentrado (por flotação ou separação imunomagnética); e iii) detecção e quantificação (por determinação colorimétrica, análise microscópica, técnicas moleculares ou infectividade) (APHA *et al.*, 2017). A grande limitação desses métodos é a necessidade de equipamentos e reagentes de alto custo, além da longa duração dos procedimentos (Luka *et al.*, 2022). Dessa maneira, se fazem necessárias formas de otimizar as análises para torná-las mais viáveis.

Diante do exposto, o presente trabalho buscou a otimização de uma metodologia de análise de *Cryptosporidium* constituída por: concentração por centrifugação, isolamento por separação imunomagnética e detecção colorimétrica. Para isso, foram realizados testes com amostras de oocistos de *Cryptosporidium parvum* combinadas com diferentes diluições dos reagentes e diferentes tempos de incubação, visando selecionar a configuração experimental mais eficiente.

OBJETIVO

Otimizar as condições experimentais (reagentes e tempo) de um método colorimétrico de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água, garantindo a sensibilidade e reprodutibilidade da análise.

MATERIAL E MÉTODOS

Oocistos de *Cryptosporidium parvum*

Oocistos de *Cryptosporidium* foram obtidos previamente por meio da concentração, purificação, quantificação e caracterização molecular de amostras fecais de bezerros naturalmente contaminados. Esses oocistos foram identificados como *Cryptosporidium parvum* do subtipo IIaA15G2R1 e foram então mantidos em solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) (Gómez-Couso *et al.*, 2012; Couso-Pérez *et al.*, 2023).

Um volume de 400 µL desta solução de oocistos foi adicionado a 14 mL de água destilada em um tubo tipo Falcon de 15 mL. O tubo foi então centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, em temperatura ambiente, com uma centrífuga de bancada (Sigma 2-7, *Sigma Laborzentrifugen GmbH*, Osterode, Alemanha). Com a formação do precipitado, removeu-se o sobrenadante do tubo com uma pipeta Pasteur até a marcação de 2 mL.

Para a quantificação dos oocistos da suspensão resultante, foi feita uma diluição de fator 1:10 adicionando-se 100 µL da suspensão em 900 µL de água destilada. Fez-se então a contagem em câmara de Neubauer aprimorada, com célula dupla de 0,1 mm de profundidade, com um microscópio de contraste de fase (BH-2, *Olympus Corporation*, Tóquio, Japão).

Com a concentração da suspensão determinada em $7{,}175.10^6$ ooc/mL, foi feita a diluição de 140 µL da suspensão em 860 µL de água destilada, resultando em uma concentração de 10^6 ooc/mL. Então, seguiu-se com uma diluição seriada até a obtenção de uma concentração de 10^3 ooc/mL, a qual foi utilizada nos testes.

Dynabeads™

Para a etapa de isolamento dos oocistos por separação imunomagnética, foram utilizadas *Dynabeads*™ do kit GC-combo (*Applied Biosystems, Life Technologies*, Oslo, Noruega). Tratam-se de microesferas superparamagnéticas de 4,5 µm de diâmetro, revestidas por anticorpos anti-*Cryptosporidium*. Os anticorpos das microesferas ligam-se especificamente aos oocistos formando um complexo.

Partículas superparamagnéticas apresentam magnetização apenas quando submetidas a um campo magnético (Gossuin *et al.*, 2009). Com a utilizacão de um ímã, os complexos microesfera-oocisto são separados da amostra e o sobrenadante é descartado. Posteriormente, é feita a dissociação dos complexos por lavagem ácida (*Thermo Fisher Scientific*, 2018).

Com as *Dynabeads*™ a uma concentração de $1{,}2.10^8$ microesferas/mL, foi utilizada nos testes uma proporção volumétrica 1:4 do reagente em relação à suspensão de oocistos, consoante às instruções do fabricante (*Thermo Fisher Scientific*, 2018).

Aptâmero biotinilado (Min_Crypto1-B)

Para reforçar a separação imunomagnética, também foi utilizado um aptâmero biotinilado de alta afinidade com oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Min_Crypto1-B), obtido por meio do truncamento do aptâmero R4-6 (Hassan *et al.*, 2021).

Aptâmeros são moléculas sintéticas de DNA ou RNA que reconhecem e se ligam especificamente a uma determinada molécula-alvo (Rahimizadeh *et al.*, 2023). Com produção econômica e estabilidade térmica e química, os aptâmeros são uma alternativa aos anticorpos (Iqbal *et al.*, 2018). E para aumentar sua afinidade de ligação com outras moléculas específicas, é feito o processo de biotinilação, *i.e.* a marcação do aptâmero com a vitamina biotina (Starikov; Nilsson, 2002).

Com o Min_Crypto1-B a uma concentração de 10 µM, foi feita a diluição de 25 µL do reagente em 475 µL de tampão fosfato-salino (PBS), resultando em uma concentração de 0,5 µM, a qual foi utilizada nos testes.

Estreptavidina-peroxidase (SA-HRP) e 3,3′,5,5′-tetrametilbenzidina (TMB)

Para a etapa de detecção colorimétrica dos oocistos, foi utilizado o reagente Estreptavidina-peroxidase (SA-HRP) e o substrato 3,3′,5,5′-tetrametilbenzidina (TMB) (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos da América).

A estreptavidina (SA) é uma proteína que se liga fortemente à biotina, presente no Min_Crypto1-B. A enzima peroxidase (HRP) é catalizadora da reação de oxidação do substrato TMB, formando um produto de cor azul. Após acidificação com ácido sulfúrico (H_2SO_4), a cor do produto muda para amarela, gerando um sinal colorimétrico que pode ser quantificado pela medição da absorbância, com pico de absorção no comprimento de onda 450 nm (Yang *et al.*, 2020).

Com o SA-HRP a uma concentração de 1 mg/mL, foram feitas três diluições do reagente em PBS: 1:5000, 1:10000 e 1:15000. Essas diluições foram testadas em diferentes configurações experimentais em três tempos de incubação com o substrato TMB: 5 minutos, 10 minutos e 15 minutos.

Configurações experimentais

Para buscar as condições ótimas do método colorimétrico de detecção de oocistos de *Cryptosporidium*, foram testadas nove configurações experimentais em triplicata, mostradas na Tabela 1:

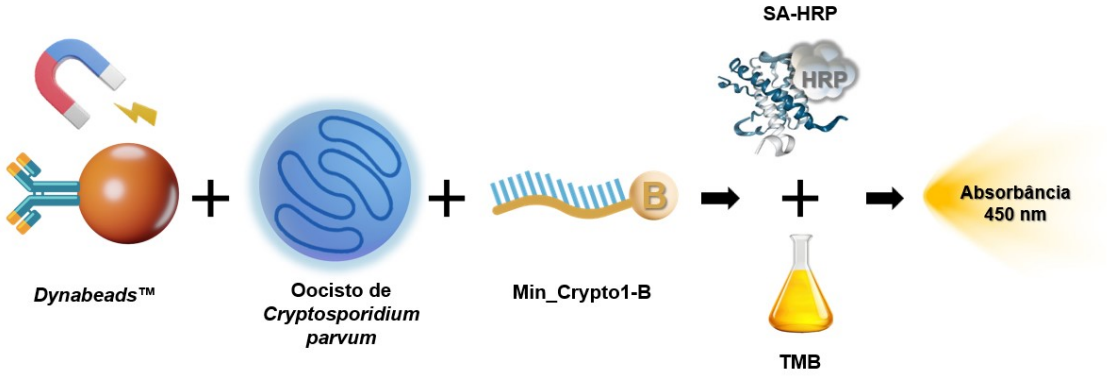
Tabela 1 - Configurações experimentais com diferentes diluições do reagente SA-HRP e diferentes tempos de incubação com o substrato TMB

Configuração experimental	Diluição SA-HRP	Tempo de incubação TMB
1	1:15000	5 min
2	1:15000	10 min
3	1:15000	15 min
4	1:10000	5 min
5	1:10000	10 min
6	1:10000	15 min
7	1:5000	5 min
8	1:5000	10 min
9	1:5000	15 min

Fonte: elaboração própria (2024).

A Figura 1 apresenta um resumo gráfico do método de detecção testado, explicado em detalhes na sequência.

Figura 1 - Resumo gráfico da detecção dos oocistos de *Cryptosporidium parvum*



Fonte: elaboração própria (2024).

A primeira etapa do método, correspondente à concentração dos oocistos, foi feita pela centrifugação da amostra, explicada anteriormente. Para cada configuração experimental, foram separados e identificados três tubos tipo eppendorf de 2 mL. Em cada tubo, foram adicionados 100 µL da suspensão de oocistos a 10^3 ooc/mL.

A segunda etapa do método, correspondente ao isolamento dos oocistos, foi feita por separação imunomagnética. Em cada tubo, foram adicionados 25 µL de *Dynabeads*™. Os tubos então foram colocados em um misturador (*HulaMixer*™, *Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos da América) por 20 minutos a 15 rpm, em temperatura ambiente. Em seguida, eles foram posicionados no ímã *DynaMag*™. Ao passo que as microesferas foram atraídas pelo ímã, o sobrenadante da amostra foi removido dos tubos.

Após retirar os tubos do ímã, 500 µL de PBS foram adicionados em cada um deles e seguiu-se com a agitação em vórtex por 10 segundos. Então, os tubos foram colocados novamente no ímã e o sobrenadante foi removido. Este protocolo de lavagem com PBS foi executado três vezes.

Reforçando a separação imunomagnética, adicionou-se aos tubos 100 µL do Min_Crypto1-B a 0,5 µM. Os tubos então foram levados à estufa por 1 hora a 37º C. Em seguida, os tubos foram colocados no ímã, o sobrenadante foi removido e executou-se o mesmo protocolo de lavagem com PBS três vezes.

A terceira etapa do método, correspondente à detecção dos oocistos, foi feita por determinação colorimétrica. Em cada tubo, foram adicionados 100 µL do SA-HRP na diluição correspondente de cada configuração

experimental (1:15000, 1:10000 ou 1:5000). Os tubos então foram levados à estufa por 30 minutos a 37º C. Em seguida, eles foram colocados no ímã, o sobrenadante foi removido e executou-se o protocolo de lavagem com PBS três vezes.

Posteriormente, foram adicionados 100 µL do substrato TMB em cada tubo. Os tubos foram então levados à estufa pelo tempo correspondente de cada configuração experimental (5, 10 ou 15 minutos) a 37º C. Em cada tubo, foram adicionados 50 µL de H_2SO_4 a 2 M e 1,35 mL de PBS. Em seguida, eles foram colocados no ímã e o sobrenadante foi transferido para novos tubos de 2 mL.

Por fim, em um espectrofotômetro UV/VIS (Lambda 365, PerkinElmer, Estados Unidos da América), foi analisada a absorbância do sobrenadante na faixa de 300 a 600 nm, observando-se um pico no comprimento de onda de 450 nm.

Análises estatísticas

Visando uma melhor interpretação dos dados obtidos nos testes, foram feitas análises estatísticas utilizando o *software Past* 4.04. Para avaliar se os valores de absorbância observados possuíam uma distribuição normal, foi feito o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Com a confirmação da normalidade dos dados, seguiu-se para as análises paramétricas. Calculou-se a média aritmética e o desvio-padrão das medidas de absorbância das triplicatas de cada configuração experimental, bem como do conjunto de configurações. Em seguida, fez-se a análise de variância (ANOVA) para verificar se as diferentes diluições do SA-HRP e os diferentes tempos de incubação com o TMB causaram variações estatisticamente significativas nos valores de absorbância, tanto de forma independente quanto combinada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta as médias e desvios-padrão das absorbâncias a 450 nm das triplicatas de cada configuração experimental e também do conjunto de configurações.

Tabela 2 - Absorbância a 450 nm das diferentes configurações experimentais

Configuração experimental	Absorbância 450 nm
1	0,09734 ± 0,00317
2	0,20770 ± 0,01915
3	0,13864 ± 0,00589
4	0,18203 ± 0,01898
5	0,37298 ± 0,00742
6	0,28712 ± 0,00623
7	0,22615 ± 0,00739
8	0,55236 ± 0,01543
9	0,23118 ± 0,01032
MÉDIA	0,25506 ± 0,12996

Fonte: elaboração própria (2024).

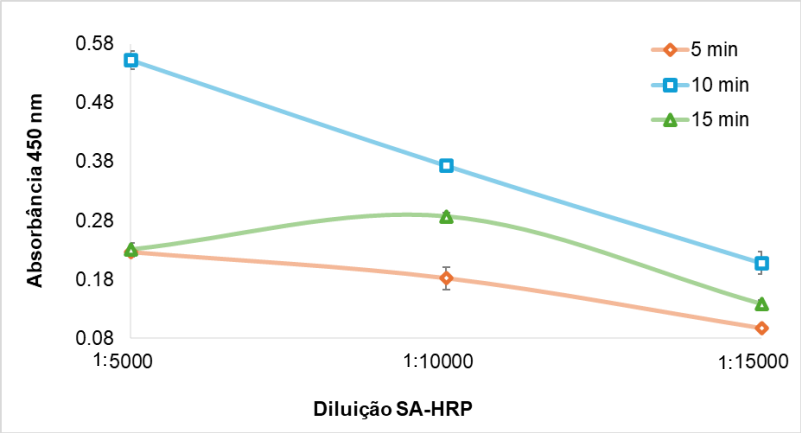
Com o teste de Shapiro-Wilk, verificou-se que as médias de absorbância das configurações experimentais têm distribuição normal ($p = 0,2147$), sendo possível realizar análises paramétricas. Com o teste ANOVA, observou-se que tanto a variação da diluição do SA-HRP quanto do tempo de incubação com o TMB provocam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na absorbância. E que a interação desses dois fatores também influencia na absorbância da amostra.

De acordo com a Lei de Beer (1852), a concentração de uma amostra é diretamente proporcional à sua absorbância. Como foi utilizada a mesma concentração inicial de oocistos de *C. parvum* em todas as

configurações experimentais, pode-se inferir que uma absorbância mais alta indica uma análise mais eficaz, onde mais oocistos conseguiram ser separados e detectados no sobrenadante final.

Como explicado anteriormente, a proteína SA se liga fortemente à biotina do Min_Crypto1-B, que por sua vez possui uma grande afinidade com os oocistos de *C. parvum*. Quanto maior a diluição do SA-HRP, *i.e.* quanto menor a concentração desse reagente na amostra, menos oocistos são separados e menor é a absorbância. Como observado no gráfico da Figura 2, a diluição 1:5000 do reagente SA-HRP gerou o maior valor de absorbância em todos os tempos de incubação com o substrato TMB.

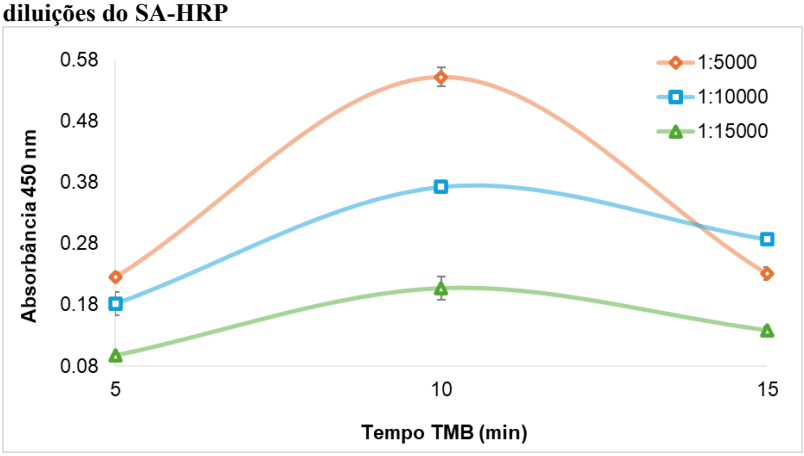
Figura 2 - Variação da absorbância a 450 nm com a diluição do SA-HRP para diferentes tempos de incubação com o TMB



Fonte: elaboração própria (2024).

Concomitantemente, a enzima HRP reage com o substrato TMB, produzindo uma cor visível. Tempos de incubação mais longos permitem um maior contato entre os reagentes, enquanto que tempos muito curtos podem impedir uma reação completa. Esse fator afeta a intensidade da cor e, consequentemente, o valor de absorbância. No entanto, é possível observar que em um determinado ponto ocorre a saturação da reação, onde a absorbância deixa de aumentar com o tempo. Como mostrado no gráfico da Figura 3, o tempo de incubação com o TMB de 10 minutos gerou o maior valor de absorbância em todas as diluições do SA-HRP.

Figura 3 - Variação da absorbância a 450 nm com o tempo de incubação com o TMB para diferentes diluições do SA-HRP



Fonte: elaboração própria (2024).

Os resultados obtidos sugerem que o tempo de incubação com o TMB de 10 minutos pode resultar na análise mais eficaz. Considerando-se que 10 minutos é uma opção intermediária entre os tempos testados, este pode ser considerado o tempo ótimo.

Em relação ao SA-HRP, a diluição 1:5000 é a mais eficaz para a detecção dos oocistos. Entretanto, não é a mais eficiente, pois requer uma maior quantidade de reagente. A diluição 1:10000, por outro lado, gerou a segunda maior absorbância em 10 minutos (0,37298 ± 0,00742) e é uma opção intermediária entre as diluições testadas, podendo ser considerada a diluição ótima.

CONCLUSÕES

A combinação da diluição 1:10000 do SA-HRP com o tempo de incubação com o substrato TMB de 10 minutos resultou na segunda maior absorbância (0,37298 ± 0,00742) entre os testes realizados. Essa configuração equilibra um sinal colorimétrico satisfatório com uma boa economia de reagentes e de tempo. Sendo assim, essas podem ser consideradas condições experimentais ótimas do método colorimétrico testado, embora sejam recomendados estudos complementares com outras concentrações de oocistos. Com um método de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* mais eficiente, o monitoramento desse protozoário nos mananciais pode ser viabilizado, contribuindo assim com a segurança hídrica.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Associação dos Engenheiros da Sabesp – AESabesp (Bolsa Prêmio Jovem Profissional 2022), da *Royal Society* (ICA\R1\201373 – *International Collaboration Awards* 2020), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Procs. 442074/2023-9, 308070/2021-6) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Código de Financiamento 001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA), WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 23 ed. Washington DC: APHA, 2017. 1540 p.

2. BEER, A. *Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten*. *Annalen Der Physik*, v.162, n.5, p.78-88, jan. 1852.

3. BOURLI, P., ESLAHI, A.V., TZORAKI, O., KARANIS, P. *Waterborne transmission of protozoan parasites: a review of worldwide outbreaks - an update 2017-2022*. *Journal Of Water And Health*, v.21, n.10, p.1421-1447, set. 2023.

4. BRASIL. Portaria nº 888, de 4 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017 para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União. 85 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 7 mai. 2021. Seção 1, p. 126-136.

5. BRASIL. SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO. Diagnóstico Temático – Serviços de Água e Esgoto: visão geral ano de referência 2022. Brasília: Ministério das Cidades, 2023.

6. COUSO-PÉREZ, S., ABELEDO-LAMEIRO, M.J., VIDAL-VARELA, A.I., GÓMEZ-COUSO, H. *Removal of the waterborne parasite* Cryptosporidium parvum *from drinking water using granular activated carbon*. *Journal Of Environmental Chemical Engineering*, v.11, n.6, p.111185, dez. 2023.

7. 6.7. GÓMEZ-COUSO, H., FONTÁN-SAINZ, M., FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P. AND ARES-MAZÁS, E. *Speeding up the solar water disinfection process (SODIS) against* Cryptosporidium parvum *by using 2.5l static solar reactors fitted with compound parabolic concentrators (CPCs). Acta Tropica*, v.124, p.235-242, ago. 2012.

8. GOSSUIN, Y., GILLIS, P., HOCQ, A., VUONG, Q.L., ROCH, A. *Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles*. *Wires Nanomedicine And Nanobiotechnology*, v.1, n.3, p.299-310, mar. 2009.

9. HASSAN, E.M., DIXON, B.R., SATTAR, S.A., STALKER, A., ÖRMECI, B., DEROSA, M.C. *Highly sensitive magnetic-microparticle-based aptasensor for* Cryptosporidium parvum *oocyst detection in river water and wastewater: effect of truncation on aptamer affinity*. Talanta, v.222, p.121618, jan. 2021.

10. HEADD, B., BRADFORD, S.A. *Use of aerobic spores as a surrogate for* Cryptosporidium *oocysts in drinking water supplies. Water Research*, v.90, p.185-202, mar. 2016.

11. IQBAL, A., LABIB, M., MUHAREMAGIC, D., SATTAR, S., DIXON, B.R., BEREZOVSKI, M.V. *Detection of* Cryptosporidium parvum *oocysts on fresh produce using DNA aptamers. Plos One*. v.3, n.10, p.e0137455, set. 2015.

12. KHALIL, I.A., TROEGER, C., RAO, P.C., BLACKER, B.F., BROWN, A., BREWER, T.G., COLOMBARA, D.V., HOSTOS, E.L., ENGMANN, C., GUERRANT, R.L. *Morbidity, mortality, and long-term consequences associated with diarrhoea from* Cryptosporidium *infection in children younger than 5 years: a meta-analyses study*. *The Lancet Global Health*, v.6, n.7, p.e758-e768, jul. 2018.

13. LUKA, G., SAMIEI, E., TASNIM, N., DALILI, A., NAJJARAN, H., HOORFAR, M. *Comprehensive review of conventional and state-of-the-art detection methods of* Cryptosporidium. *Journal Of Hazardous Materials*, v.421, p.126714, jan. 2022.

14. MOUSSA, A.S., ASHOUR, A.A., SOLIMAN, M.I., TAHA, H.A., AL-HERRAWY, A.Z., GAD, M. *Fate of* Cryptosporidium *and* Giardia *through conventional and compact drinking water treatment plants*. *Parasitology Research*, v.122, n.11, p.2491-2501, ago. 2023.

15. NIEMINSKI, E., DURRANT, G.C., HOYT, M.B., OWENS, M.E., PETERSON, L., PETERSON, S., TANNER, W.D., ROSEN, J., CLANCY, J.L. *Is E. Coli an appropriate surrogate for* Cryptosporidium *occurrence in water? Journal AWWA*, v.102, n.3, p.65-78, mar. 2010

16. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Risk Assessment of* Cryptosporidium *in Drinking Water*. Geneva: World Health Organization, 2009. 134 p.

17. RAHIMIZADEH, K., ZAHRA, Q.U.A., CHEN, S., LE, B.T., ULLAH, I., VEEDU, R.N. *Nanoparticles-assisted aptamer biosensing for the detection of environmental pathogens. Environmental Research*, v.238, p.117123, dez. 2023.

18. STARIKOV, E.B., NILSSON, L. *Structural basis of biotin–RNA aptamer binding: a theoretical study. Chemical Physics Letters*, v.363, n.1-2, p.39-44, set. 2002.

19. THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Dynabeads™ GC-Combo: Publication No. MAN0014121*. Waltham: *Thermo Fisher Scientific*, 2018.

20. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule Toolbox Guidance Manual*. Washington: USEPA, 2010. 375 p.

21. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Method 1623.1:* Cryptosporidium *and* Giardia *in Water by Filtration/IMS/FA*. Cincinnati: USEPA, 2012. 83 p.

22. YANG, H., ZHANG, Q., LIU, X., YANG, Y., YANG, Y., LIU, M., LI, P., ZHOU, Y. *Antibody-biotin-streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) sensor for rapid and ultra-sensitive detection of fumonisins. Food Chemistry*, v.316, p.126356, jun. 2020.