

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO**



Análisis comparativo de métodos de concentración y técnicas de identificación de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp* en muestras de agua no potable para consumo humano.

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE
LICENCIADA EN LABORATORIO CLÍNICO**

Presentado por:

Karen Cecilia Roque Herrera

Asesor:

Lic. Luis Roberto Paniagua Castro

Ciudad Universitaria, julio de 2018.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

AUTORIDADES ACADÉMICAS

Rector

Msc. Roger Armando Arias Alvarado

Vicerrector académico

Dr. Manuel de Jesús Joya

Vicerrector administrativo

Ing Agr. Nelson Bernabé Granados

FACULTAD DE MEDICINA

Decana

Dra. Maritza Mercedes Bonilla Dimas

Vicedecana

Licda. Nora Elizabeth Abrego de Amado

ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

Directora

Licda. Dalide Ramos de Linares

LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO

Directora

Msp. Miriam Cecilia Recinos de Barrera.

AGRADECIMIENTOS

A Gloria Herrera, mi madre una mujer excepcional, sabia, astuta, hermosa, amorosa y valiente, gracias por brindarme éste regalo mamá, mi educación académica.

A mi abuelita Rosa y mi abuelo Mauricio, no se imaginan lo agradecida que estoy con ustedes, por el amor que me han brindado, y por inculcarme paciencia, honradez y humildad.

A mi tía Blanca Orellana, gracias por toda la ayuda que me brindó a través de mis años de carrera, por su tiempo y consejos.

A mi tío Mauricio por proporcionarme el equipo necesario para realizar la investigación.

A Álvaro Ramos, te agradezco tanto todo ese valioso y constante apoyo, toda esa ayuda, esos ánimos que me diste a cada paso que daba. Gracias por estar a mi lado.

Agradezco al licenciado Abel Godoy por otorgarme la idea de éste proyecto, y por brindarme su ayuda y conocimientos durante el proceso.

Gracias a mi asesor, licenciado Paniagua, por guiarme con sus conocimientos y paciencia hacia el éxito de mí defensa.

Karen Cecilia Roque Herrera.

CONTENIDO

CAPÍTULO I	6
RESÚMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVOS.....	15
General.....	15
Específicos	15
HIPÓTESIS.....	15
CAPÍTULO II	16
MARCO TEÓRICO.....	17
<i>Cryptosporidium</i>	17
Antecedentes	19
Distribución	19
Ciclo de vida	20
Forma de transmisión.	21
Criptosporidiosis.....	22
<i>Giardia lamblia</i>	23
Antecedentes	24
Distribución	25
Ciclo de vida	25
Forma de transmisión	25
Giardiasis	26
MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN O ENRIQUECIMIENTO.	28
Técnicas de sedimentación	29
Técnica de sedimentación espontánea en tubo (TSET)	30
Formol- éter	30
Método de flotación.....	31

Técnica de flotación por SHEATHER.....	32
Técnica de flotación con sulfato de zinc	34
Técnica de floculación	34
Filtración.....	36
Metodologías para la identificación de <i>Giardia lamblia</i> y <i>Cryptosporidium</i>	
<i>spp.</i>	36
Examen directo	36
Tinciones	37
Inmunofluorescencia.....	38
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
CAPÍTULO III.....	42
DISEÑO METODOLÓGICO	43
Tipo de estudio.....	43
Delimitación de la investigación.....	43
Forma de obtención de datos	43
Análisis de los datos	43
CAPÍTULO IV	44
RESULTADOS TABLA 2. Síntesis de los hallazgos encontrados en los artículos	
analizados en ésta investigación.	45
ANÁLISIS.....	53
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	61
ANEXOS.....	64
GLOSARIO:.....	87
REFERENCIAS.....	89

CAPÍTULO

I

RESÚMEN

La presente investigación tuvo como objetivo principal el determinar el método más idóneo para la concentración de muestras de agua y la técnica más adecuada para la identificación de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp*, en el procesamiento de muestras de agua no potable para consumo humano. Esta investigación es de carácter documental, los datos obtenidos provienen de estudios realizados en diferentes regiones de América latina principalmente. Ésta investigación plantea como problemática el desconocimiento de la mejor metodología para recuperar y posteriormente identificar los protozoarios mencionados, el interés se deriva de la necesidad que existe en el país por asegurar a través del Laboratorio Nacional de Referencia la completa ausencia de todo microorganismo patógeno en agua para consumo, y para asegurarlo se necesitan de metodologías adecuadas; según la OMS tanto *Cryptosporidium spp* y *Giardia intestinalis* se encuentra ligados a la transmisión a través del agua de consumo causando enfermedad, las aguas recreativas y, en menor medida, los alimentos contaminados, que se han relacionado con la aparición de brotes. Según la frecuencia de cada metodología y técnica, y el porcentaje de recuperación parasitaria, se analizó la problemática, y se infirió en que los métodos de concentración para muestras de agua idóneos son la filtración y sedimentación; mientras que las técnicas de inmunofluorescencia y reacción en cadena de la polimerasa se consideran técnicas efectivas, sensibles y específicas para la detección de *Cryptosporidium spp* y *Giardia intestinalis*.

Debido a los hallazgos, no se apoya la hipótesis planteada, ya que se descubrió que según las necesidades del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) se pueden emplear mejores metodologías a las utilizadas en la actualidad.

INTRODUCCIÓN

Es un hecho lamentable de que aún en nuestros tiempos, algunas regiones del país no sean abastecidas con agua potable para ulterior consumo, por ende, para suplir ésta necesidad vital se recurre al consumo de aguas subterráneas, que son todas las aguas presentes en los poros y grietas de las rocas bajo la superficie de la Tierra, este no es un tema desconocido para los lectores, ya que en algún momento han oído sobre el agua de pozo, la cual es la forma de obtención mejor conocida de dicha preciada fuente natural de agua. Sin embargo, es usual considerar que, por ser ésta obtenida de manera natural se encuentre limpia, inclusive estéril, es decir lista para el consumo por las personas sin la idea de que se correrá algún peligro para la salud. Lamentablemente esto en la realidad no es así, ya que los mantos acuíferos son fáciles de contaminar, primordialmente con heces humanas, esto ocurre cuando el pozo se encuentra cerca de una letrina, o una granja, ya que mediante la filtración de los desechos a través de la tierra ya sean estos humanos o animales, logran llegar hasta el agua y contaminarla con distintos patógenos. Sin embargo, y gracias a la cloración, se puede evitar el desarrollo de la mayoría de microorganismos, ya sean estos bacterias, y/ o parásitos patógenos; lamentablemente hay dos protozoarios que no se pueden erradicar mediante el hipoclorito de sodio, ello debido a sus mecanismos de resistencia ante las condiciones agresivas del ambiente, y como el lector ya ha asumido, dichos protozoos son *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp*, que son los protozoarios de importancia primaria en agua para consumo humano y aguas residuales. Estos organismos causan diarrea variando la severidad, y causando brotes asociados con el agua, que han sido atribuidas según para cada agente. *Giardia* es la que con mayor frecuencia es identificada en brotes epidémicos asociados con el agua. Desde 1965 hasta 1990,

111 brotes en agua y más de 23000 casos de giardiasis fueron reportados. *Cryptosporidium* es un protozoo que causa preocupación como patógeno humano. Este puede causar una diarrea parecida al cólera, que es auto limitada en individuos inmunocompetentes, pero puede ser prolongada en personas inmunodeficientes. *Cryptosporidium* ha sido asociado con diarrea del viajero, y su consumo en el agua ha sido implicado como vehículo de transmisión de brotes epidémicos severos de dichas enfermedades. (Moe Christine, 1995).

Por lo antes expuesto, que se ha tomado la decisión de averiguar qué métodos se pueden aplicar para la correcta identificación de estos protozoos, y de esta manera asegurar la salubridad del agua de pozo que muchas poblaciones consumen, disminuyendo al menos la incidencia de giardiasis y criptosporidiasis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La frontera existente entre los microorganismos del medio ambiente y el ser humano es gracias a barreras en forma de métodos de desinfección hídrica, que aún no ha eliminado totalmente el riesgo de determinadas enfermedades de transmisión a través del agua; las de importancia en ésta investigación son las enfermedades parasitarias, ello debido a la resistencia de ciertos patógenos ante métodos de desinfección como lo es el uso del hipoclorito de sodio, que al ser la forma más utilizada, por la población, para la purificación de fuentes de agua para consumo comunitario, es de interés y responsabilidad del estado analizar e identificar la existencia de patógenos, de especial importancia *Cryptosporidium spp* y *Giardia lamblia*, que son protozoarios que indican contaminación fecal en cuerpos de agua, y que más bien al contrario de su esperada erradicación de ella, éstos continúan desarrollando patologías en las que se aprecia un aumento de casos por la ineficacia de los métodos actuales de tratamiento, entre ellas encontramos criptosporidiasis y giardiasis, erradicar dichas enfermedades producidas por el consumo principalmente de agua se ve limitado debido a la resistencia de éstos protozoarios a la cloración; por ello consideradas ambas enfermedades emergentes.

En ciertas zonas de El Salvador, la población aún mantiene fuentes de agua subterránea para consumo, por ejemplo ríos y pozos, por tal motivo es indispensable que se mantengan vigilancias microbiológicas de esos cuerpos hídricos; en El Salvador tal vigilancia es realizada por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) desde el año 2002, en coordinación con la Dirección de Saneamiento Ambiental a través de los inspectores de Saneamiento Ambiental, quienes están encargados de la toma y envío de las muestras, el área de Laboratorio de Salud y Medio Ambiente (LSMA) es el encargado del análisis microbiológico, donde se realiza estudio de

parásitos en muestras de agua: de agua superficial, pozo y punto de uso utilizada para consumo humano por el método de “concentración de parásitos por sedimentación”, con posterior examen al fresco del sedimento recuperado, metodología adaptada por el LSMA desde el año 2,002 (LSMA, 2002). A pesar de la adaptación de ésta metodología, se ignora la capacidad del método para la concentración de los parásitos de interés para la salud debido a que no se ha desarrollado una metodología estandarizada que se adapte a las necesidades del LSMA para la investigación de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp.*

Para el LNR son protozoarios de interés en el análisis de agua debido a que se debe notificar la ausencia total de toda forma parasitaria, según la OMS tanto *Cryptosporidium spp* y *Giardia intestinalis* se encuentra ligados a la transmisión a través del agua de consumo causando enfermedad, las aguas recreativas y, en menor medida, los alimentos contaminados, que se han relacionado con la aparición de brotes (OMS, 1998, Pág. 6-7; OMS 2006, pág. 13); sin embargo, a pesar de contar con un método de concentración para su identificación e inmediato examen microscópico al fresco, no se cuenta con un método estandarizado o de mayor sensibilidad ante la identificación de éstos parásitos en muestras de agua. Por lo antes expuesto, se pretende, mediante un análisis netamente documental, comparar distintas metodologías empleadas en estudios dirigidos a la concentración e identificación de *Cryptosporidium spp* y *Giardia lamblia* en cuerpos de agua, estudios realizados en diferentes regiones, principalmente zonas del continente americano, cuyas condiciones ambientales son parecidas a las de nuestro país, El Salvador.

Por lo expuesto anteriormente, se planteó:

- ❑ ¿Cuáles son los principales métodos para la concentración de parásitos en agua para consumo humano no potable?
- ❑ ¿Cuáles son las principales técnicas empleados para la identificación de parásitos en agua para consumo humano no potable?
- ❑ ¿Qué técnica para la concentración e identificación de parásitos en agua para consumo humano no potable se adapta a las necesidades del LNR costo/ beneficio?

JUSTIFICACIÓN

La razón fundamental por la cual se decidió llevar a cabo ésta investigación, fue debido a que se pretendió conocer qué método de concentración es el más idóneo al procesar muestras de agua para consumo humano no potable, y a partir de ello, cuál es la técnica por la cual se lleva a cabo la identificación de los parásitos *Cryptosporidium spp* y *Giardia lamblia*, que son protozoarios patógenos que parasitan el tracto digestivo humano, produciendo respectivamente, patologías como criptosporidiosis y giardiasis.

La criptosporidiosis es una enfermedad cuyos síntomas más comunes incluyen diarrea, náuseas, fiebre, cólicos estomacales y el vómito. En las personas saludables, la enfermedad normalmente dura de 1 a 2 semanas. En las personas con sistemas inmunodeficientes, (personas con enfermedades tales como VIH positivos, cáncer, o personas con un trasplante de órgano reciente), la infección podría ser grave y aún durar más (TEXAS, Health and Human Services, 2011); y giardiasis que similar a la criptosporidiosis, es una enfermedad diarreica, suele haber dolor abdominal, náuseas, anorexia, flatulencias, meteorismo, aerogastria y pérdida de peso (CDC, 2015) , ambas patologías se transmiten a través de la ingesta de alimentos o agua contaminada.

Cryptosporidium spp y *Giardia lamblia* son los protozoarios de mayor interés desde el punto de vista sanitario para el agua de consumo humano debido a la resistencia a métodos de cloración que éstos presentan. Para la OMS en su Guía para la calidad del agua potable, tercera edición volumen 1, en sus apartados 1.1.1 aspectos microbiológicos y 2.2.1 Calidad microbiológica del agua, los protozoos entéricos son más resistentes a la desinfección, y si no se garantiza la

seguridad del agua, la comunidad puede quedar expuesta al riesgo de brotes de enfermedades intestinales y otras enfermedades infecciosas. Es particularmente importante evitar los brotes de enfermedades transmitidas por el agua de consumo, dada su capacidad de infectar simultáneamente a un gran número de personas y, potencialmente, a una gran proporción de la comunidad. (OMS, 2006, Pág. 13, 32 y 33).

Según el código de salud de El Salvador, en su sección ocho, Agua Potable, artículo 63, el cual estipula que “El agua destinada para el consumo humano deberá tener la calidad sanitaria que el Ministerio conceptúa como buena y exigirá el cumplimiento de las normas de calidad en todos los abastecimientos de agua utilizadas para el consumo humano. En tal virtud y para determinar periódicamente su potabilidad los propietarios o encargados de ellos permitirán las inspecciones del caso.” (República de El Salvador, Diario Oficial, 2009).

Por ello la significancia de la implementación de técnicas idóneas para la concentración e identificación de los protozoarios de importancia sanitaria se ve fundamentada y necesaria para el aseguramiento de la salubridad del agua para consumo en múltiples comunidades de nuestro país. Con el análisis de los hallazgos y evaluación de diferentes metodologías para el diagnóstico de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp*, se pondrá a disposición del LNR para que puedan ser estudiadas por las autoridades, para la implementación de la metodología que mejor se adapte a las necesidades del LSMA en la vigilancia de parásitos en agua.

OBJETIVOS

General

- ✓ Determinar el método de concentración y la técnica para la identificación más idónea de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp*, en el procesamiento de muestras de agua no potable para consumo humano.

Específicos

- ❑ Establecer las principales metodologías para la concentración de parásitos en agua para consumo humano no potable.
- ❑ Identificar cuáles son las principales metodologías empleadas para la identificación de parásitos en agua para consumo humano no potable.
- ❑ Establecer la técnica para la concentración e identificación de parásitos en agua para consumo humano no potable que se adapte a las necesidades del LNR.

HIPÓTESIS

- ✓ El método más idóneo para la concentración e identificación de parásitos en agua no potable para consumo humano, es el que se emplea actualmente en el Laboratorio Nacional de Referencia, el cual consiste en recibir 5 L de muestra, de los cuales 200 mL se someten a doble centrifugación por 5 minutos a 2500 rpm, observando el sedimento mediante un examen al fresco.

CAPÍTULO

II

MARCO TEÓRICO

Una particular característica de los organismos parásitos es su gran capacidad de adaptación a cambios del medio ambiente, entre muchos cambios, el que nos es de mayor importancia es la resistencia a la cloración; hay dos protozoos cuya presencia en el agua potable es motivo de preocupación de las autoridades sanitarias norteamericanas desde hace ya algunos años y que se ha vuelto de preocupación a la vista de la última directiva de agua de consumo humano. Para El Salvador solo se estipula en la NSO 13.07.01:08 (Normativa Salvadoreña Obligatoria) la ausencia de todo organismo patógeno, en los que se incluyen estos protozoos resistentes al hipoclorito de sodio: *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp.* Mientras el primero es viejo conocido de los manuales de parasitología, el segundo es un protozoo "nuevo" de estrepitosa aparición que alcanzó la fama mundial en 1993 en Milwaukee, estado norteamericano de Wisconsin, donde afectó a más de 400.000 personas y provocó la muerte de cerca de un centenar de ellas.

Para comprender con mayor criterio, la relevancia de éstos patógenos encontrados en fuentes de agua para consumo, hay que explicar a cada uno de ellos:

Cryptosporidium

El género *Cryptosporidium* pertenece al Phylum Apicomplexa, clase Conoidasida, orden Eucoccidiorida, familia Cryptosporidiidae. A pesar de las similitudes en sus ciclos de vida, varias características distinguen al género *Cryptosporidium* del resto de los coccidios: relativa especificidad de hospedador, capacidad de autoinfección endógena, localización intracelular y extracitoplasmática en la célula hospedadora.

El género *Cryptosporidium*, incluye aproximadamente 15 especies y es el causante de la criptosporidiosis, enfermedad considerada principalmente como una parasitosis gastrointestinal cuya principal vía de contagio es la oral, siendo el agua un importante agente para su diseminación. Otros factores de riesgo son el estado inmunológico, la edad y estado nutricional del individuo, así como el número de parásitos causantes de la infección y de las condiciones del medio ambiente, ya que los ooquistes mantienen su infectividad durante un tiempo relativamente largo y son muy resistentes a los desinfectantes, esto debido a que el ooquiste presenta una pared que puede ser fina o gruesa, la pared está compuesta por tres capas visibles al microscopio electrónico y presenta una línea de sutura por donde emergen los esporozoítos. (Parija, 2017).

La capa externa, de 5 nm de espesor, presenta abundante material filamentosos y glicoproteínas ácidas; puede ser parcialmente eliminada por efecto del hipoclorito de sodio. Está separada por 5 nm de distancia de una capa central rígida y electrodensa, de 10 nm de espesor, de composición lipídica y glicoproteica, lo que le confiere propiedades de ácido-alcohol resistencia. La capa interna, de composición glicoproteica, presenta 20 nm de espesor. Ésta provee a la pared cierta rigidez y a la vez elasticidad. Una característica única que distingue al género es la presencia de una línea de sutura en la pared del ooquiste, la cual durante el desenquistamiento permite la salida de los esporozoítos. La pared del ooquiste, rica en uniones disulfuro, permite mantener la capacidad infectiva del parásito. Los ooquistes mantienen su viabilidad a temperaturas entre 4 °C y 22 °C, y sobreviven a -20 °C. Temperaturas superiores pueden acelerar su tiempo de degradación, al igual que los procesos de congelación rápida. El cuerpo residual presenta elementos esenciales para la supervivencia del parásito. En su interior se

encuentran una vacuola lipídica característica, inclusiones proteicas, ribosomas, citomembranas y gránulos de amilopectina, los que proveen nutrición a los esporozoítos. La concentración de amilopectina ha servido como marcador indirecto de la viabilidad, ya que a mayor tiempo y temperatura de conservación, su concentración disminuye

Antecedentes

Descubierto en 1907 por Tizzer en ratones, no fue hasta 1976 cuando Nime y Col registran el primer caso en humanos, ellos encuentran al parásito en una biopsia rectal de una niña y se identifica al *Cryptosporidium* como causa grave de enteritis. Pero la importancia como patógeno humano ha venido en aumento desde 1980, cuando se encontró como causa importante de diarrea en pacientes con infección por VIH. De manera progresiva se ha encontrado como agente etiológico de diarrea en otras entidades con deficiencia inmune, trasplantados, deficiencia selectiva de IgA, hipogammaglobulinemia y uso de medicamentos inmunosupresores. A partir de ese momento comienzan a aparecer brotes hídricos de criptosporidiasis de manera puntual hasta el desastre de Milwaukee en 1993, en que la escalada de brotes descritos se sucede sobre todo en Estados Unidos, Canadá y Reino Unido. La prevalencia en estos países no tiene una significación epidemiológica clara sino que responde más bien al especial estado de alerta de sus servicios sanitarios con respecto al microorganismo y su enfermedad.

Distribución

Cryptosporidium parece estar ampliamente distribuido en la naturaleza infectando a muchos animales hospedadores (animales de compañía y fauna agroganadera).

En las materias fecales son eliminados ooquistes esféricos o elipsoides, que miden 4 μm a 6 μm . Estos son las formas parasitarias infectantes para las personas o animales. (Botero, 2005, pág. 98). Actualmente, se ha demostrado que la parasitosis está más difundida de lo que en un principio se pensaba. Esto está en estrecha relación con la resistencia que presentan los ooquistes en la naturaleza y la escasa capacidad de las depuradoras y potabilizadoras para eliminarlos mediante tratamientos convencionales.

Ciclo de vida

El género *Cryptosporidium* como todas las coccidias, posee un ciclo de vida asexuado y otro sexuado en el mismo huésped, los cuales suceden en el interior de los enterocitos en las infecciones intestinales. Este ciclo [anexo 1] se inicia con la reproducción asexuada, cuando el ooquiste infectante se desenquista y libera cuatro esporozoítos móviles, el desenquistamiento es un proceso que se cumple exclusivamente en parásitos metabólicamente activos y que involucra la acción de enzimas parasitarias como la cisteín proteinasa, cuya función es degradar moco, y en segundo lugar, la acción de enzimas intestinales. Los requerimientos necesarios para iniciar el desenquistamiento incluyen cambios en la temperatura y el pH, sales biliares y acción de proteasas. El contacto directo entre los ooquistes y el ácido siálico presente en la superficie de las células intestinales también constituye un estímulo para el desenquistamiento; los esporozoítos liberados invaden las células para convertirse en trofozoítos y esquizontes (merogonia), de primera y segunda generación. Los merozoítos (merontes) procedentes de esta segunda generación, pueden reinvadir las células y producir reinfección. Estos merontes inician el ciclo sexuado con microgametocitos y macrogametocitos, que dan origen a células masculinas (microgametos) y femeninas (macrogametos). Éstos se unen, forman cigotes y luego ooquistes:

unos de pared delgada que autoinfectan, y otros de pared gruesa, con tres capas, que salen al exterior para contaminar otros huéspedes. La reproducción se hace dentro de una vacuola parasitófora en las células de las microvellosidades, que se observan como prominencias. La localización de estas vacuolas es intracelular pero extracitoplasmática. El contacto inicial entre el parásito y el glicocálix de la célula huésped, produce un acortamiento o ausencia de las microvellosidades, con atrofia y aumento de tamaño de la cripta [Anexo 2]. Se observa en la mucosa y hasta la lámina propia un infiltrado moderado de células mononucleares.

El yeyuno es la localización intestinal en donde existe mayor infección, se localiza dentro de las células en cepillo de la mucosa intestinal. Se ha encontrado diseminación en pacientes inmunosuprimidos, principalmente con sida, a faringe, esófago, estómago, duodeno, íleon, colédoco, apéndice, colon, recto y pulmones, en cuyo caso pueden encontrarse los ooquistes en el esputo; la respuesta inmune relacionada con criptosporidiosis tiene componentes celulares y humorales. Hay alteraciones de las células T, y aparece en pacientes VIH positivos con CD4 menor de 100 células por microlitro en quienes la parasitosis es más severa. En la inmunidad humoral existe respuesta específica de anticuerpos IgG, IgM e IgA. Hay evidencia epidemiológica de inmunidad protectora por infecciones repetidas en áreas endémicas. No obstante el desarrollo de anticuerpos no implica la curación de la enfermedad como se observa en pacientes con SIDA. (BOTERO, 2005)

Forma de transmisión.

La ruta de transmisión al hombre, de tipo fecal-oral, puede realizarse de persona a persona, de animal a persona o por ingestión de agua o alimentos contaminados. La dosis infectante puede

oscilar de 30 a 132 ooquistes; aunque al parecer tanto el hombre como los animales tienen distintos grados de susceptibilidad a este parásito y el inoculo probablemente puede variar de un individuo a otro. (Parte-Pérez, 2005). Los animales reservorios son muchos, por lo cual se considera una zoonosis frecuente.

Criptosporidiosis

La infección se presenta en dos formas, según sea el estado inmunitario del huésped:

Immunocompetentes: Aproximadamente el 30% de los casos infectados son asintomáticos. En los sintomáticos la diarrea y el dolor abdominal son los síntomas principales, pero tener en cuenta, que frecuentemente los pacientes positivos para *Cryptosporidium*, pueden tener a la vez otros agentes infecciosos (parásitos, bacterias y virus), que pueden causar o contribuir a esa sintomatología. El período de incubación es aproximadamente de siete días. La sintomatología oscila entre la sensación de indigestión y un cuadro de enteritis con diarrea de tipo agudo o crónico. La diarrea generalmente es acuosa, rara vez con moco, sangre y leucocitos. Se presentan de cinco a diez episodios diarreicos al día, y después de un tiempo puede seguirle estreñimiento. En niños con diarrea intensa o crónica, se puede asociar a deshidratación. La diarrea puede perdurar por largo tiempo, causar pérdida de peso y afectar el crecimiento y la nutrición. La diarrea y otros síntomas digestivos son más frecuentes en menores de cinco años y en niños desnutridos. Los menores de un año son más sintomáticos cuando no reciben leche materna. Los pacientes pueden presentar además dolores abdominales, ocasionalmente fiebre, cefalea, anorexia, vómito y pérdida de peso. Generalmente la enfermedad se autolimita a 10-14 días. En una cuarta parte de los pacientes puede llegar a más de un mes. Los parásitos pueden permanecer por seis semanas o más después de la mejoría clínica.

Inmunodeficientes: En estos pacientes los síntomas son más intensos y de larga duración. La diarrea es crónica y ocurre una enfermedad debilitante con malestar, anorexia y fiebre. Hay pérdida de líquidos y electrolitos, que pueden causar enfermedad grave o muerte por deshidratación. También puede causar un síndrome de malabsorción que compromete seriamente el estado general. En los pacientes con SIDA, además de la localización intestinal, se ha encontrado diseminación con complicación pulmonar. Causa una neumonía intersticial con intensa tos seca y sibilancias. Se han informado casos de colecistitis con colestasis, fiebre, dolor abdominal, marcada pérdida de peso y también de pancreatitis. La enfermedad es más frecuente en los pacientes con SIDA, pero también ocurre en otras inmunodeficiencias como hipogammaglobulinemias, terapia inmunosupresora, desnutrición, leucemia, linfoma y otros defectos de la inmunidad. Pueden presentarse casos asintomáticos en inmunosuprimidos, pero menos frecuente que en los inmunocompetentes. (BOTERO, 2005, Pág. 101)

Giardia lamblia

Giardia lamblia también conocida como *Giardia intestinalis* o *G. duodenalis*, es un protozoo binucleado y flagelado, es un protozoo más conocido que *Cryptosporidium* y, al igual que éste, se encuentra en una amplia variedad de animales (donde vive en los intestinos en forma de trofozoito) que habita el intestino delgado de humanos y otros mamíferos; y en el agua (donde vive en forma de quiste), y es el agente responsable de la giardiasis.

El trofozoíto de *G. intestinalis* tiene forma piriforme y en la parte anterior posee dos núcleos que se unen entre sí en el centro, con la apariencia de anteojos. Mide aproximadamente 15 μ de longitud, por 7 μ de ancho. Posee una cavidad o ventosa que ocupa la mitad anterior de su

cuerpo, la cual utiliza para fijarse a la mucosa intestinal, y un axostilo en cuyo extremo anterior emergen cuatro pares de flagelos: uno anterior, dos laterales, y otro posterior.

El quiste tiene forma ovalada con doble membrana, de dos a cuatro núcleos, de él emergen dos trofozoítos y presenta algunas de las estructuras descritas para éste, de las cuales es notorio el axostilo. El tamaño promedio es de 10 μm de longitud. Es la forma infectante y resistente en el ambiente, agua principalmente. El protozoo es expulsado más a menudo en forma de quiste

Antecedentes

El primer protozoo parásito fue visto en 1681 por Anrhony Van Leeuwenhoek, a través de su rudimentario microscopio, en una muestra de sus propias materias fecales, que correspondió al flagelado *Giardia*. El protozoo no tuvo trascendencia para la medicina en esa época, y fue necesario que lo redescubriera el profesor de anatomía patológica checo: Vilém Lambl, de la Universidad de Praga, quien 178 años después (1859), vio el protozoo (tanto el trofozoíto como el quiste) en las materias fecales gelatinosas de un niño. Los comparó con renacuajos y les dio el nombre de *Cercomonas intestinalis*. Blanchard (1885) observó parásitos intestinales similares en renacuajos, y los llamó *Giardia agilis*. Más tarde el género fue puesto en honor del zoólogo Alfred Giard que nada tuvo que ver con el parásito, Blanchard, en el mismo año, reconoció a Lambl como el descubridor y lo denominó *Lambliia intestinalis*.

Stiles en 1915, juntó los dos nombres y lo llamó *Giardia lamblia*.

La controversia persistió hasta 1952, cuando Filice propuso los nombres de *Giardia intestinalis* y *Giardia duodenalis*. Actualmente lo más aceptado es *Giardia intestinalis*.

Distribución

Comparte además otras propiedades comunes con *Cryptosporidium*, como la gran supervivencia de los quistes, su presencia en las aguas potables y su dispersión por todo el mundo. Es el agente parasitario más probable entre los que infectan a personas en un país desarrollado y en Estados Unidos se considera endémico, con una proporción de portadores del 15-20%. Su incidencia en nuestro país es mayor que para *Cryptosporidium*.

Ciclo de vida

Los trofozoítos se localizan en el intestino delgado, fijados a la mucosa, principalmente en el duodeno. Allí se multiplican por fisión binaria y los que caen a la luz intestinal dan origen a quistes, los que se caracterizan por poseer una rígida pared glicoproteica externa que les permiten sobrevivir al ser expulsado con las materias fecales inclusive frente a la acción de los desinfectantes más comunes, puede sobrevivir por más de dos meses en agua a 8°C y alrededor de un mes a 21°C. Sin embargo, los quistes son sensibles a la desecación, el congelamiento y la luz solar. [Anexo 3]

Forma de transmisión

La transmisión ocurre por vía fecal – oral, desde que haya contacto con material, agua o alimentos contaminados con heces; necesita una dosis infectante baja (10 a 100 quistes viables) Una cantidad de hasta 10 quistes probablemente menos de esa cantidad de quistes viables pueden ser ingeridos por el humano y ser infectado con ellos, se encuentran en agua de consumo humano, los cuales son suficientes para iniciar una infección.

Un individuo infectado puede excretar hasta 10^6 quistes por gramo de heces. Los quistes pueden sobrevivir hasta por dos meses en agua para consumo almacenada a una temperatura de 8°C por contaminación fecal de humanos o animales en el agua puede desencadenar transmisión de la giardiasis en una población que consuma esa fuente de agua.

La mayoría de documentos que hablan sobre brotes de giardiasis surgidos a partir del consumo de agua, están asociados a fuentes de agua de consumo municipal, donde el único tratamiento era la cloración. Los quistes de *Giardia* son más resistentes a la desinfección a comparación, por ejemplo de bacterias coliformes. (Moe Christine, 1992, pág 9-125)

Los trofozoítos no son infectantes cuando entran por vía oral. Cuando son eliminados en las heces diarreicas mueren en el exterior. La infección es principalmente persona a persona, pero se ha comprobado que algunos animales como perros, gatos, castores y rumiantes, pueden ser reservorios de *G. intestinalis*, y por consiguiente dan origen a infección en humanos, en cuyo caso esta parasitosis se puede considerar como una zoonosis.

Giardiasis

El principal mecanismo de acción patógena, en giardiasis, se debe a la acción de los parásitos sobre la mucosa del intestino delgado, principalmente del duodeno y yeyuno. La patología que se presenta con manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea y malabsorción de nutrientes.

Esta acción se hace por fijación de los trofozoítos por medio de la ventosa y da origen a inflamación catarral. La patología principal se encuentra en infecciones masivas, en cuyo caso la barrera mecánica creada por los parásitos y la inflamación intestinal, pueden llegar a producir

un síndrome de malabsorción. En estos casos las vellosidades intestinales se encuentran atrofiadas, hay inflamación de la lámina propia, y alteraciones morfológicas de las células epiteliales. Las pruebas de absorción de vitaminas A y B12. Se ha relacionado la patología de esta parasitosis con la presencia de hipogammaglobulinemia, principalmente deficiencia de IgA secretoria. Algunos casos de giardiasis graves se han asociado con la presencia de hiperplasia nodular linfoide en intestino delgado y grueso. No se acepta que haya invasión a vías biliares, y por consiguiente no es correcto atribuirle patología hepatobiliar a esta parasitosis.

La sintomatología de la giardiasis, principalmente la diarrea, tiene mecanismos multifactoriales, que se pueden dividir en dos grupos:

Lesiones de la mucosa. La alteración de las vellosidades intestinales puede ser: por atrofia e inflamación con aumento de linfocitos o por la presencia de productos secretorios y excretorios de los parásitos, que lesionan los enterocitos.

Factores luminales. Estos pueden dividirse en dos subgrupos: 1- Aumento de la microbiota bacteriana, con capacidad de desdoblar las sales biliares y dificultar la absorción; 2- Disminución de enzimas (disacaridasa, tripsina y lipasa), que aumentan la eliminación de grasa y contribuyen a la malabsorción de electrolitos, solutos y agua.

Inmunidad: La prevalencia en zonas endémicas es dos a tres veces mayor en niños que en adultos, atribuible a la adquisición de anticuerpos protectores, por infecciones repetidas. También la prevalencia y la sintomatología son mayores en adultos extranjeros que visitan zonas endémicas, comparadas con adultos nativos de la región. Se pueden detectar anticuerpos circulantes en pacientes infectados, los cuales se mantienen hasta por seis meses después de

que la parasitosis se haya curado. En estos pacientes la IgE total en suero está aumentada. · En zonas endémicas los niños alimentados con leche materna presentan menor prevalencia y menor sintomatología, debido a los anticuerpos transmitidos por la madre.

La identificación y diagnóstico de los agentes infecciosos oportunistas anteriormente descritos, se puede realizar a través de variadas técnicas (directas o indirectas), con diferentes especificidades, sensibilidades, limitaciones, ventajas, desventajas y dependen del tipo de muestra usada. Cuando se pretende detectar en agua, los métodos son diferentes, requiriendo varios litros de agua para concentración. Es importante indicar que la recuperación de los parásitos es variable según la solución y técnica ejecutada para concentración. (BARBOSA, 2013, pág. 120).

A continuación se describen los métodos diagnósticos más factibles para estos protozoarios:

MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN O ENRIQUECIMIENTO.

La finalidad de la concentración es separar los parásitos de la masa de material de la muestra, (formada por bacterias, arena, detritos vegetales, etc.) y tratar de aumentar la cantidad de microorganismos para favorecer su visualización debido a la escasez de ellos en la muestra de agua. Por estas causas se emplean métodos de concentración de la muestra de agua por sedimentación, flotación o bien una combinación de los dos. Un método de enriquecimiento siempre debe ir acompañado de una observación directa de la muestra no solo para evaluar la eficacia en el método de concentración empleado sino también porque estas técnicas

generalmente no concentran los trofozoítos y en algunos casos puede presentarse esta forma parasitaria únicamente.

Técnicas de sedimentación

Se basa en la concentración de elementos parasitarios por la acción de la gravedad, y se lleva a cabo suspendiendo la muestra. Estos métodos son principalmente útiles para la concentración de quistes, ooquistes y huevos, determinando así la presencia de parásitos intestinales y no intestinales patógenos para el ser humano, es decir que son aplicables para casi todos los parásitos y son recomendados de uso general cuando el diagnóstico no está orientado a ningún parásito en particular. La desventaja que tienen con respecto a los de flotación es que a veces la observación microscópica puede dificultarse por la presencia de la concentración de restos no parasitarios. De seleccionarse una técnica de rutina se sugiere un método de sedimentación por las siguientes ventajas: es más fácil de realizar, está sujeto a menos errores técnicos, no requiere observación microscópica inmediata y es aplicable a la concentración de la mayoría de los parásitos intestinales. Hay una gran variedad de métodos de sedimentación, sin embargo el que es mayormente utilizado para la concentración de parásitos en agua, y el adaptado a las necesidades del LNR es de la siguiente manera: método de “concentración de parásitos por sedimentación”

- Se mezcla la muestra de agua por inversión 25 veces.
- Verter 50 mL en cuatro tubos cónicos estériles descartables para centrifugación
- Centrifugar por 5 minutos a 2500 rpm
- Aspirar el sobrenadante de cada tubo por encima del sedimento hasta la marca de 5 mL

- Mezclar el sedimento de cada tubo y colocarlo en un solo tubo
- Centrifugar por 5 minutos y aspirar el sobrenadante; dejar 1 mL de muestra
- Resuspender el sedimento agitando el tubo
- Extraer con pipeta Pasteur 1 – 2 gotas de la suspensión y colocar en portaobjetos, cubriéndolo con cubreobjetos
- Examinar con el objetivo 10X Y 40X para observar estructuras internas.
- Descartar la lámina en recipiente de descarte con paredes rígidas conteniendo hipoclorito de sodio al 1 %. (LSMA, 2016)

Técnica de sedimentación espontánea en tubo (TSET)

- Se separan aproximadamente 25 mL de agua de la muestra y se vierte en un tubo cónico de plástico de 13 x 2.5cm, de 50 mL de capacidad filtrándola a través de gasa (si hubiesen restos vegetales u otro material sólido).
- Se deja a temperatura ambiente, 24 horas aproximadamente.
- Se elimina el sobrenadante y con una pipeta se toma una muestra del fondo del tubo. Y se observa el sedimento. (AYALA, 2011).

Formol- éter

El formol fija los huevos y larvas de helmintos y los quistes de protozoarios. El éter emulsifica las grasas y el tritón vence la tensión superficial.

El procedimiento para la de terminación de parásitos por la técnica de formol éter se lleva a cabo dejando sedimentar 24h 10 L de muestra, luego de lo cual se elimina 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 agrega 10 mL de solución de formaldehído al 10% y se vortmeriza (por medio de un agitador tipo vórtex o

mezclador de vórtice, que es un dispositivo simple que se usa comúnmente en los laboratorios para agitar pequeños tubos o frascos de líquido) durante 3 minutos, luego de los cuales se agrega 10 mL de éter dietílico y se centrifuga la mezcla a 1050 x g por 10 minutos, posteriormente se procede a eliminar las fases de solvente orgánico ubicados por encima del sedimento y éste se almacena a -4°C hasta su visualización.

Método de flotación

Al contrario que en la sedimentación, en la cual los parásitos microscópicos, que son más pesados que las bacterias, y las partículas pesadas van al fondo del recipiente, la flotación utiliza un medio líquido de suspensión más pesado que los parásitos y éstos suben a la superficie y pueden ser recogidos de la película superficial. Para que el método sea útil, no basta con que el medio de suspensión sea más pesado que los objetos que han de flotar, sino que además no ha de producir retracciones en el parásito que impidan el reconocimiento. La ventaja de estos métodos es que producen una preparación más limpia de deyección que el procedimiento de sedimentación, facilitando mucho su observación microscópica. Las desventajas es que aquellos parásitos con mayor peso específico que la solución empleada no flotarán (que es lo que a veces sucede con huevos infértiles de *Ascaris lumbricoides* o huevos operculados) y que el tiempo en que debe hacerse la observación microscópica es menor debido a que la película superficial puede destruirse y los parásitos caer al fondo del tubo. Un laboratorio que utilice solo métodos de flotación puede no recuperar todos los parásitos presentes; para asegurar la detección de todos deberá examinar cuidadosamente no solamente la película superficial sino también el sedimento. En este grupo hay también una gran cantidad de métodos, entre ellos mencionamos:

Técnica de flotación por SHEATHER

Su propósito es separar, concentrar y recobrar Ooquistes de *Cryptosporidium spp.*

Características de la flotación:

Los ooquistes de apicomplexa pueden deformarse un poco; pueden tomar un color rosa pálido en su interior. Habrá que diferenciar de levaduras, *Blastocystis hominis*, otras estructuras.

Existen otros métodos de flotación en los que se utiliza un detergente (Tween 80) Los Tween o polisorbatos son ésteres del polioxietilen sorbitano (sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con 4, 5, o 20 moles de óxido de etileno) parcialmente esterificados con ácidos grasos superiores.

Preparación de reactivos:

- Solución concentrada fenolada de azúcar
- Azúcar en cristales 500 g
- Agua destilada 320 mL
- Fenol en cristales. 6.5 g

Disolver el azúcar en el agua destilada, usando calor sin dejar llegar a ebullición.

Filtrar por gasa. Agregar el fenol y agitar hasta disolución. Guardar en frasco tapado y rotulado.

Para trabajar es más fácil mantener la solución de trabajo en un frasco con dispensador.

Muestra requerida: Muestra de agua recolectada en frasco de vidrio de boca ancha, con tapadera, limpio y debidamente identificado.

- Tomar la muestra del fondo del frasco con una pipeta Pasteur

- Mezclar el agua con la pipeta Pasteur y aspirar

- Verter 2-3 mL en un tubo de ensayo rotulado, centrifugar, descartar el sobrenadante al frasco con la muestra original o en un recipiente con desinfectante y continuar trabajando con el sedimento.

- Colocar gasa en 2 dobleces dentro de un embudo introduciendo éste en otro tubo de ensayo rotulado y filtrar la suspensión para remover fibras y partículas grandes. Tapar con parafilm o tapón de hule.

- Centrifugar a 1,500 rpm por 2 minutos. Destapar. Decantar el sobrenadante.

- Añadir un poco de solución fenolada azucarada al sedimento y agitar vigorosamente con un aplicador. Completar con más solución hasta 2 cm bajo el borde del tubo sin dejar de agitar.

Tapar con parafilm o tapón de hule.

- Centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos.

- Remover el tapón con sumo cuidado para no agitar. Tomar 2-3 asadas de la superficie del menisco y colocar sobre un porta-objetos. Flamear el asa en el mechero.

- Cubrir la preparación con un cubre-objetos y examinar en el microscopio óptico toda la preparación.

Buscar los ooquistes con objetivo 10X a diferentes profundidades; a menudo flota y se colocan justo debajo del cubre-objetos.

Para confirmar, utilizar mayor magnificación. Puede usar esta preparación para colorear; basta remover el cubre-objetos, dejar secar y colorear.

Descartar el material utilizado en frasco con desinfectante. (KamínsRi R. G, 2003)

Técnica de flotación con sulfato de zinc

La suspensión se centrifuga durante 3,5 minutos a 1.800 rpm (750 x g). (Todas las centrifugaciones se efectuaron sin frenado mecánico). El sobrenadante se decanta, la última gota se drena sobre una sección limpia de toalla de papel, y se añade solución acuosa de ZnSO₄ (gravedad específica de 1,195 a 1,200) a una pulgada (aproximadamente 25,4 mm) del borde del tubo. El sedimento empacado se resuspende usando dos varillas aplicadoras, hasta que no quede partículas gruesas. Esta suspensión se centrifuga inmediatamente a 1.500 rpm (500 x g) durante 1,5 minutos, se transfiere sin agitación a un estante que la sostenga en posición vertical y se deja reposar durante 1 minuto para compensar cualquier movimiento perturbador que se produjera durante la transferencia desde la centrífuga. (Marilyn S. Bartlett, 1978)

Técnica de floculación

Los términos coagulación y floculación se utilizan ambos indistintamente en colación con la formación de agregados. La confusión proviene del hecho de que frecuentemente ambas operaciones se producen de manera simultánea. Para aclarar ideas definiremos coagulación como la desestabilización de la suspensión coloidal, mientras que la floculación se limita a los fenómenos de transporte de las partículas coaguladas para provocar colisiones entre ellas promoviendo su aglomeración. Por tanto:

Coagulación: Desestabilización de un coloide producida por la eliminación de las dobles capas eléctricas que rodean a todas las partículas coloidales, con la formación de núcleos microscópicos.

Floculación: Aglomeración de partículas desestabilizadas primero en microfloculos, y más tarde en aglomerados voluminosos llamados flóculos.

El método de floculación consiste en una combinación de reactivos, que aumentan la densidad de los parásitos de manera que éstos precipiten:

- Añadir 10 mL de cloruro de calcio (ClCa_2) 1M por cada litro de muestra
- seguido por 10 mL de carbonato de sodio (NaHCO_3) 1M por cada litro de muestra, agitando cada vez que se incorporaron los reactivos.
- Se mide el pH ajustándolo a 10 con hidróxido de sodio (NaOH) 3N. si la muestra tiene un pH mayor de 10 no es necesario modificarlo ni corregirlo con ácido.
- Se deja sedimentar durante toda la noche, o por 24 h.
- Transcurrido este tiempo, se extrae el sobrenadante evitando remover el sedimento
- Al sedimento se le agrega ácido sulfámico ($\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$) hasta la completa disolución
- El resultado obtenido se trasvasa a tubos falcon de 50 mL para centrifugarlos a 2.500 rpm durante 5 minutos.
- Luego se extrae el sobrenadante de cada tubo y se realiza una mezcla del mismo punto de muestreo, se centrifuga nuevamente con las mismas condiciones descritas anteriormente, obteniéndose así las muestras a la que se le pueden aplicar los métodos de Solución Salina Fisiológica (0,85 %), Lugol y Kinyoun. (Gallego Jaramillo L. M, 2014)

Filtración

- Se procede a realizar el filtrado, de ser posible, de la totalidad de la muestra recolectada. Para esto se coloca un embudo de vidrio u otro material sólido de 20 cm de diámetro en cuyo interior se coloca el papel de filtro, por ejemplo Whatman N°5 (estéril), todo montado en un soporte universal, se filtra el agua por éste dispositivo, recogiendo el agua filtrada en otro recipiente, y repitiendo el filtrado 25 veces por muestra, sin cambiar el papel de filtro, al cabo del último filtrado
- Se descarta completamente la muestra de agua y con ayuda de una pinza, se toma el papel de filtro y se deja remojar en un tubo de decantación con agua destilada estéril durante 24 horas
- Al cabo de este tiempo, el papel de filtro se deshace y para asegurarse de su completa desintegración se pasa por un vortex por 5 minutos.
- Se realiza un filtrado simple de este material con papel Whatman n°1 recolectando el líquido filtrado en un tubo cónico de centrifuga
- Se lleva a centrifugar por 25 minutos a 1500 rpm. Al cabo de ese tiempo, se descarta el sobrenadante, y con la ayuda de una pipeta Pasteur se toma el sedimento para su análisis. (Ayala, 2011)

Metodologías para la identificación de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp.*

Examen directo

Observación de los microorganismos al microscopio, en vivo, sin ninguna tinción previa. Se emplea cuando interesa observar alguna característica del organismo vivo, como el movimiento

de algunas bacterias, o la morfología de protozoos. El examen en gota pendiente es uno de los métodos más conocidos de examen directo. Consiste en poner en un portaobjetos, que posee una concavidad, una gota de la suspensión de microorganismos que es objeto de examen, cubrirla con un cubreobjetos y observarla al microscopio con los objetivos, 10X y 40X.

Tinciones

Tinción de Kinyoun (método en frío)

Para la Técnica de Kinyoun se realiza un frotis, sobre una lámina portaobjeto, deslizando la muestra sobre 2/3 parte en el centro del mismo.

- Se dejó secar completamente a temperatura ambiente
- Se fija con metanol (10 minutos) y se deja secar.
- Luego se cubre completamente con fucsina básica fenolada. (no más de 15 minutos)
- Se coloca la lámina en una jarra de Koplín, se lava con agua de chorro
- Se decolora mediante lavado sucesivo con una solución de ácido sulfúrico al 1% por dos minutos, o hasta que el frotis no emita colorante, también, para lograr la decoloración se puede sumergir durante 20 segundos la lámina en un preparado de alcohol ácido (Etanol: 97mL; Ácido clorhídrico al 99%: 3mL).
- Enjuagar nuevamente con agua de chorro y se dejar secar.
- Por último, se cubre con una solución de azul de metileno al 3 % durante 1 minuto.

- Al finalizar este tiempo, se lava con agua de chorro y se deja secar. La muestra se observa con el objetivo de inmersión de 100 X. (Arnedo, 2008)

Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula. Es una técnica que tiene variantes cuantitativas, y cualitativas (la inmunotinción de células para su observación por microscopía fluorescente).

La inmunofluorescencia, como todos los inmunoensayos, aprovecha la capacidad que tienen los anticuerpos para unirse con alta especificidad a una determinada molécula blanco; pero se diferencia de otras técnicas inmunohistoquímicas en que aquí la marca unida al anticuerpo es una molécula fluorescente tal como por ejemplo, el isotiocianato de fluoresceína. El anticuerpo marcado se hace reaccionar contra un preparado biológico y luego se expone la muestra así tratada a una fuente de luz de onda corta (ultravioleta) seleccionada por medio de un monocromador. Esta luz de onda corta genera un fenómeno de fluorescencia en la molécula marcadora que a su vez emite luz a una longitud de onda más larga (verde, amarillo o naranja). Esta luz emitida puede ser cuantificada con facilidad por fotometría o en el caso de tratarse de preparados histológicos, puede ser observada por medio de un microscopio de fluorescencia. En el caso de la utilización de la inmunofluorescencia como método de tinción para microscopía óptica, el fluorescente revela la localización a nivel celular o subcelular de la molécula diana. (Burtis, 2008)

La inmunofluorescencia, como técnica de tinción, puede ser utilizada en cortes de tejidos, líneas celulares cultivadas, células individuales y secreciones que contengan células en suspensión, y en el caso de nuestro interés: agua, con la finalidad de analizar la presencia y distribución de proteínas, glúcidos y moléculas pequeñas tanto de origen biológico como no.

Existen varios diseños de microscopios que pueden ser utilizados para el análisis de preparados histológicos marcados por inmunofluorescencia. El más simple de todos es el microscopio de epifluorescencia, aunque también es ampliamente utilizado el microscopio confocal.

La inmunofluorescencia como técnica inmunoquímica de cuantificación se puede utilizar tanto en muestras de origen biológico como en muestras no biológicas, siempre que se encuentren en un medio favorable para la unión de los anticuerpos. En general se utiliza una solución PBS (Buffer fosfato salino) como medio de reacción.

La técnica de Inmunofluorescencia directa: La inmunofluorescencia primaria, o directa, también conocida por sus siglas IFD (inmunofluorescencia directa), hace uso de un único anticuerpo que se encuentra químicamente unido a un fluorocromo. El anticuerpo reconoce la molécula diana y se une a ella directamente.

Esta técnica presenta algunas ventajas con respecto a la IFI (indirecta), es más rápida y por otro lado es menos sensible a interferencias debidas a reactividad cruzada de los anticuerpos o a reacciones no específicas.

La técnica de Inmunofluorescencia directa se puede llevar a cabo empleando los anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína: A300FL Giardia-a- GloTM (Waterboinc,INC) para la

determinación de *G. lamblia*; y A400FL Crypto- a- GloTM (Waterboinc, INC) para la de *C. parvum*. Cinco mL de cada muestra es filtrada 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 agrega sobre el filtro 30 µl del anticuerpo respectivo y se incuban en oscuridad el filtro a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se lava el exceso de fluorocromo con buffer fosfato salino (PBS) y se monta en portaobjetos para la visualización al microscopio de inmunofluorescencia, 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 observarán 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 reporta en número de quistes y ooquistes por 100 L de muestra colectada, tomando en cuenta la fórmula que se presenta a continuación:

TABLA 1 fórmula para reportar el número de quistes y ooquistes/100L de muestra colectada.

$N = n \times S \times D / P \times V$		
N= Número de quistes u ooquistes en el volumen de muestra analizada.	n= número promedio de quistes u ooquistes por campo luego de contar más de 30 campos diferentes seleccionados al azar	S= área de la superficie del filtro
D= factor de dilución	P= Área del campo	V= volumen de muestra filtrada

Fuente: BRACHO, 2007.

- La inmunofluorescencia secundaria, o indirecta (también conocida por sus siglas IFI) hace uso de dos anticuerpos; el anticuerpo primario es el que reconoce y se une a la molécula diana,

mientras que el secundario que es el que se encuentra marcado con el fluoróforo, reconoce al primario y se une a él. Esta técnica es un poco más compleja que la IFD (inmunofluorescencia directa), requiere más pasos y es más posible que sufra interferencias, pero en contrapartida es mucho más flexible que una técnica directa y debido a que es posible que un anticuerpo primario una a más de anticuerpo secundario, implica un efecto de amplificación que también aumenta la sensibilidad de la técnica

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*polymerase chain reaction*), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis. Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad, virus o bacterias causantes de una enfermedad. Partiendo de un DNA molde, una enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por la unión de los cebadores al molde. En primer lugar es necesario que el DNA se desnaturalice, O sea que las dos cadenas de DNA se separen y para que esto pase se eleva la temperatura aproximadamente a 90°C. El siguiente paso consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al DNA molde. Temperaturas habituales en esta fase oscilan entre 35 y 60°C la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios. La temperatura depende de los cebadores.

CAPÍTULO

III

DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio Es un estudio de carácter documental y exploratorio.

Delimitación de la investigación: La población que se incluyó en la investigación fue todo artículo o estudio relacionado con la problemática, el cual expuso la utilización de metodologías para la concentración e identificación de *Cryptosporidium spp* y *Giardia lamblia*. En esta investigación se analizaron un total de 15 estudios.

Forma de obtención de datos: Para la realización de éste estudio, se utilizaron documentos proporcionados principalmente por el Instituto Nacional de Salud, que se encuentran en revistas como PubMed, Scielo, Plos one, Tropical Parasitology, Red de revistas científicas de América Latina, Revista cubana de medicina Tropical; éstos documentos incluyeron:

Métodos de concentración de parásitos en muestras de agua, ya sean éstos de sedimentación, flotación, floculación, filtración u otros. Métodos para identificar los parásitos en el agua.

Análisis de los datos: Para ésta investigación se realizó el análisis de los datos según las conclusiones expuestas por cada unidad de observación, el porcentaje de recuperación parasitaria que cada investigación tuvo en relación al número de muestras analizadas, y la frecuencia en la que se empleó cada método para concentración y técnica de identificación, se elaboró una tabla comparativa con las siguientes variables: volumen de muestra, tipo de muestra, condiciones de transporte y almacenamiento, metodología para la concentración e identificación empleada, porcentaje de recuperación de parásitos y formas parasitarias identificadas. Según las principales metodologías se mencionaron la sensibilidad y especificidad para que de esta manera inferir conclusiones y recomendaciones adecuadas, finalmente se presentó una tabla con los precios de las técnicas de mayor interés.

CAPÍTULO

IV

RESULTADOS

TABLA 2. Síntesis de los hallazgos encontrados en los artículos analizados en ésta investigación.

n°	Título de la investigación	Tipo de muestra	Muestras analizadas	Volumen de muestra	Obtención de la muestra	Transporte y almacenamiento	Concentración de la muestra	Identificación de parásitos	% de recuperación por cantidad de mxs analizadas	Parásitos identificados
1	Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. [Anexo 4]	Agua de pozo	5	20 L	Frascos de vidrio y plástico de uno a tres litros de capacidad	Trasladadas al laboratorio en neveras con hielo y conservadas a 4 °C	Filtración Centrifugación Flotación: mediante técnica de Sheater	Examen al directo con NaCl 0.85 % -Tinción: Giemsa y Ziehl-Neelsen	100 %	<i>G. lamblia</i> , <i>Cryptosporidium spp</i> , <i>B. hominis</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. cayetanensis</i> ,
2	Identificación de parásitos intestinales en agua de pozos profundos de cuatro municipios. Estado Aragua, Venezuela. 2011-2012 [Anexo 5]	Agua de pozo (agua subterránea)	56	20 L	Frasco de 20 L de capacidad, boca ancha, con tapa hermética y previamente esterilizados		Floculación	- Examen directo: SSF, Lugol - Tinción: Kinyoun	37.5 %	<i>Giardia intestinalis</i> , <i>Esporas de Microsporidium</i> , <i>Entamoeba histolytica/dispersa</i> , <i>Blastocystis sp</i> , <i>Endolimax nana</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i>
3	<i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Giardia lamblia</i> en aguas crudas y tratadas del estado Bolívar, Venezuela [Anexo 6]	Agua de grifo Agua de pozo Agua tratada	21 (7 antes de tratamiento del agua y las otras 7 luego de éste)	3 -4 L	Frasco de vidrio estériles y protegidas con papel alrededor del cuello de la botella con una capacidad 3-4L	En la muestra de aguas tratadas, por cada 100 cc de agua se le añadió 0,1 de tiosulfato de sodio, que detiene la acción bactericida del cloro	Filtración Concentración "Agua-Éter"	Inmunofluorescencia de MeriFluor	Antes del tratamiento: <i>Cryptosporidium parvum</i> : 85,7% (n=6/7)Y <i>Giardia lamblia</i> 71,4% (n=5/7). Luego del tratamiento ambos se observaron en un 14.3 % (n 1/7)	

n°	Título de la investigación	Tipo de muestra	Muestras analizadas	Volumen de muestra	Frasco	Transporte y almacenamiento	Concentración de la muestra	Identificación de parásitos	% de recuperación según las mxs	Parásitos identificados
4	Occurrence of <i>Giardia intestinalis</i> and <i>Cryptosporidium sp.</i> in wastewater samples from São Paulo State, Brazil, and Lima, Perú. [Anexo 7]	Estado de Sao Paulo, Brazil	23	50 mL	En bolsas plásticas estériles: método de hisopo de Moore	Almacenado en refrigeración	Centrifugación	PCR	En el Estado de São Paulo, se detectó <i>Cryptosporidium</i> en 21.2% (7/23) y <i>G. lamblia</i> 65.2% (15/23)	
5	Occurrence of <i>Giardia intestinalis</i> and <i>Cryptosporidium sp.</i> in wastewater samples from São Paulo State, Brazil, and Lima, Perú [Anexo 8]	Lima, Perú Muestras de agua residual	10	150 mL	Frascos plásticos	Procesadas el mismo día	Centrifugación	PCR	<i>Cryptosporidium</i> 50% (5/10) <i>G. lamblia</i> 60% (6/10)	
6	Gastrointestinal diseases and causal effects in the Valle de Juárez, Chihuahua, México [Anexo 9]	Agua doméstica	38	15 L	recipiente de plástico previamente desinfectado	La muestra se colocó en una hielera, para transportarse al Laboratorio de microbiología de la UaCJ y se mantuvo en un cuarto frío a 4 oC,	- Ultrafiltración - Separación inmunogenética	Inmunofluorescencia	55% a uno o ambos parásitos	
7	Técnicas para la detección de <i>Cryptosporidium sp.</i> en sistemas de tratamiento de agua residual [Anexo 10]	Agua residual	10	4 L	recipientes plásticos previamente desinfectados	trasladaron al laboratorio en una cava con hielo para su procesamiento inmediato	- sedimentación x 24h - centrifugación	Tinción: Kinyoun Inmunofluorescencia directa	100% por ambas técnicas	<i>Cryptosporidium</i> spp <i>C. parvum</i>

n°	Título de la investigación	Tipo de muestra	Muestras analizadas	Volumen de muestra	Frasco	Transporte y almacenamiento	Concentración de la muestra	Identificación de parásitos	% de recuperación según las mxs	Parásitos identificados
8	Protozoarios en aguas superficiales y muestras fecales de individuos de poblaciones rurales del municipio Montes, estado Sucre, Venezuela [Anexo 11]	Agua superficial	75	5 L	Envases plásticos transparentes, limpios y con tapa de rosca	Trasladadas a temperatura ambiente	- Sedimentación x 48 h - Centrifugación - Floculación	-Tinción: Kinyoun y Tricrómica	100 % de las muestras se encontraron parásitos. <i>Amibas</i> 16-40 % <i>Blastocystis sp</i> 16-32 % <i>Giardia sp</i> 8 – 20 % <i>Chilomastix sp</i> 8-20 % <i>Pentatrichomonas sp</i> 4-20 % <i>Endolimax sp</i> 12-16 %	
9	El agua subterránea como agente transmisor de protozoos intestinales. [Anexo 12]	Agua tratada (clorada)	9	4000 L de agua proveniente de perforaciones	A través de filtros de hilo de polipropileno tejido, con 1 micrometro de porosidad	Filtro transportado en doble bolsa de polietileno y refrigerados con hielo húmedo	- Flotación: con sulfato de zinc solución de Sheather	-Examen directo: Lugol - Tinción: tricromica, Ziehl Neelse, Kinyoun	De los 9 puntos de muestreo 7 se obtuvo presencia: 77.7 %	<i>Cryptosporidium spp</i> (1) <i>E. histolytica/disenteriae</i> (4) <i>E. coli</i> (2) <i>G. lamblia</i> (2)
10	Recuento y determinación de viabilidad de <i>Giardia spp.</i> Y <i>Cryptosporidium spp.</i> en aguas potables y residuales en la cuenca alta del río Bogotá [Anexo 13]	Agua residual	4	10 L	Muestreador metálico con un soporte al extremo donde se insertaba un frasco de plástico	Se almacenaron en un garrafón de plástico y se transportaron al laboratorio para ser procesados el mismo día	- Técnica floculación inorgánica	Tinción: colorantes vitales DAPI e IP inmunofluorescencia	25 %	<i>Cryptosporidium spp</i> (solo en un punto de muestreo)

n°	Título de la investigación	Tipo de muestra	Muestras analizadas	Volumen de muestra	Frasco	Transporte y almacenamiento	Concentración de la muestra	Identificación de parásitos	% de recuperación según las mxs	Parásitos identificados
11	Recuento y determinación de viabilidad de <i>Giardia spp.</i> Y <i>Cryptosporidium spp.</i> en aguas potables y residuales en la cuenca alta del río Bogotá. [Anexo 14]	Agua potable	4	20 L	Garrafones de plástico con capacidad de 20 litros	Transportadas de inmediato al laboratorio para ser procesadas el mismo día.	- Filtración	Tinción: colorantes vitales DAPI e IP Inmunofluorescencia	100 %	<i>G. lamblia</i> (3 puntos de muestreo) <i>Cryptosporidium sp</i> (1 punto de muestreo)
12	Presencia de <i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Giardia lamblia</i> en agua potable [Anexo 15]	Agua potable	26	20 L	Botellas de polipropileno estériles desinfectadas (7mx) filtrado de 1000 L de agua por filtro de polipropileno de micra de porosidad (19mxs)	Muestras se colocaron en una cava con hielo y se trasladaron al laboratorio para su inmediato procesamiento.	- Floculación - Formol éter	- Examen directo: SSF, Lugol - Tinción: Kinyoun - Inmunofluorescencia directa	mediante inmunofluorescencia (14/26) 53.85 % de <i>G. lamblia</i> y (20/28) 77 % para <i>C. parvum</i>	
13	<i>Cryptosporidium spp</i> y otros enteroparásitos en aguas Recreacionales de la represa horizonte. Upata, estado Bolívar [Anexo 16]	Agua recreacional	40	4-5 L Se procesaron 10 ul	Recipientes de plásticos, con capacidad de 5 L. Y esterilizados a 120°C por 15 minutos, protegidas con papel estéril alrededor del cuello de la botella		- Sedimentación: Centrifugación y Técnica de Sedimentación Espontánea en Tubo	Examen directo con solución salina 0.85% y lugol Tinción: Kinyoun Inmunofluorescencia	23/40= 57.50 %	<i>Blastocystis spp</i> <i>Giardia spp</i> <i>E. coli</i> <i>E. nana</i> <i>Cryptosporidium spp</i> <i>A. lumbricoides</i> <i>T. trichiura</i>

n°	Título de la investigación	Tipo de muestra	Muestras analizadas	Volumen de muestra	Frasco	Transporte y almacenamiento	Concentración de la muestra	Identificación de parásitos	% de recuperación según las mxs	Parásitos identificados
14	Presencia y caracterización molecular de <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> en agua de lago recreativo en Tianjin, China: un estudio preliminar. [Anexo 17]	Agua superficial	52	20 L	Recipiente de plástico de 20 L	Las muestras fueron transportadas en hielo al laboratorio de inmediato	<ul style="list-style-type: none"> - Filtración - Flotación - Centrifugación 	<ul style="list-style-type: none"> - Inmunofluorescencia - PCR 	82,7% (43) y 98,1% (51) de las muestras fueron positivas para <i>Cryptosporidium</i> ooquistes y <i>Giardia</i> quistes, respectivamente	
15	<i>Cryptosporidium</i> spp. and <i>Giardia</i> spp. in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms [Anexo 18]	31		10 L	Contenedores de plástico		<ul style="list-style-type: none"> - Filtración por membrana - Floculación 	<ul style="list-style-type: none"> - Inmunofluorescencia directa - PCR 	<i>G. duodenalis</i> y <i>C. parvum</i> en 3 muestras= 3/31: 10 %	

Fuente: anexos 4 – 18

Para realizar el correcto análisis del estudio, se tabuló y graficó por separado los parámetros de interés: frecuencia en que se emplearon los métodos de concentración y técnicas para la identificación; y el porcentaje de recuperación de los métodos de concentración según el número de muestras empleadas en cada estudio.

TABLA 3 frecuencia de métodos de concentración de las muestras.

Método de concentración	Frecuencia
FILTRACIÓN	6
CENTRIFUGACIÓN	7
FLOCULACIÓN	5
FLOTACIÓN	3
CONCENTRACIÓN FOLMOL ÉTER	1
SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA	1
SEDIMENTACIÓN ESPONTÁNEA	3

Fuente: investigaciones 1-15; tabla 2

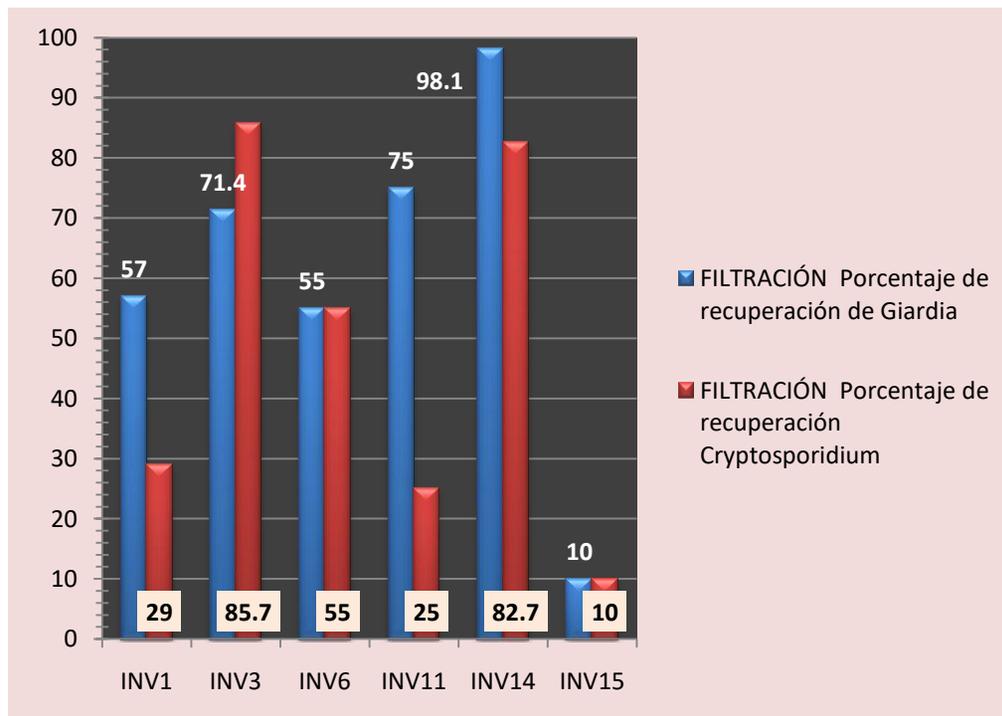
Tabla 3: Según la frecuencia en que fue utilizada el método de concentración de las muestras, tenemos en orden descendente, el método de concentración más utilizado por los 15 estudios analizados fue: la filtración fue utilizada como método para concentrar parásitos un total de 6 veces, la centrifugación 7 (sin embargo solamente en 5 estudios fue empleada como método de concentración principal) y floculación fueron empleadas 5 veces.

TABLA 4 frecuencia de métodos de identificación de las muestras

Método para la identificación	Frecuencia
EXAMEN DIRECTO	5
TINCIÓN GIEMSA	1
TINCIÓN ZN	1
TINCIÓN KINYOUN	5
INMUNOFLUORESCENCIA	9
PCR	4
TINCIÓN TRICRÓMICA	2

Tabla 4: el método para la identificación de parásitos más utilizado fue la inmunofluorescncia, seguida por el examen directo y la tinción de Kinyoun, muestras que a pesar de su sensibilidad y especificidad PCR fue empleado tan solo en 4 de las 15 estudios analizados.

Gráfico 1
Porcentaje de recuperación de *Cryptosporidium* y *Giardia* mediante el método de filtración



Fuente: Tabla 5

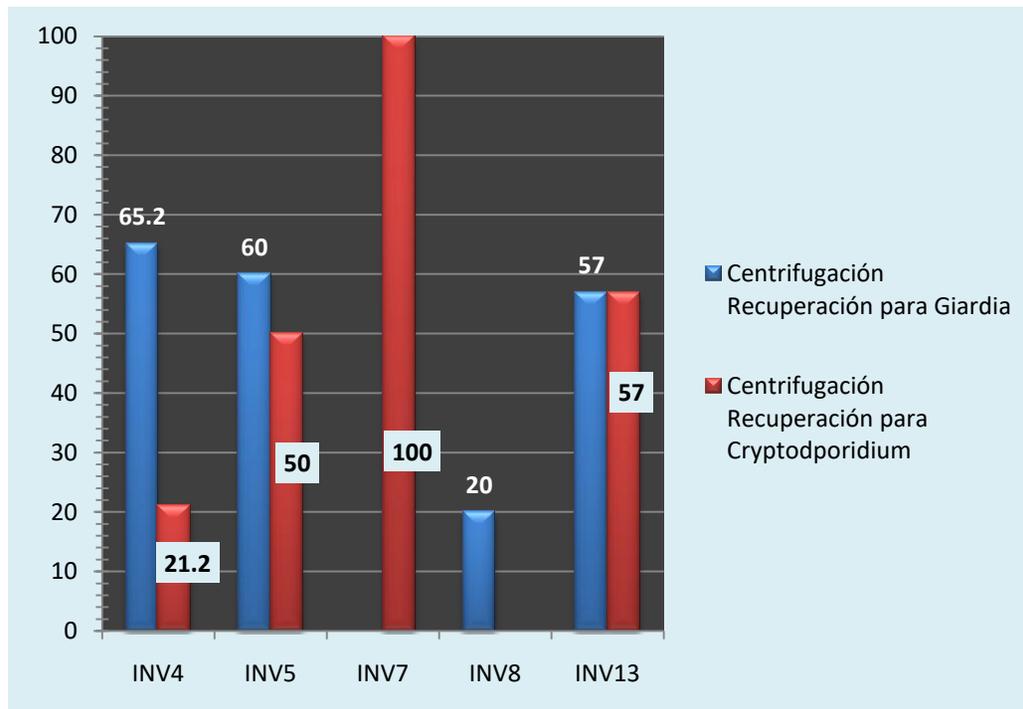
En el gráfico número 1 podemos observar que de los 15 estudios analizados en esta investigación, 6 de ellos emplearon como método de concentración de parásitos la **filtración**

A la vez el gráfico nos permite comparar que el porcentaje de recuperación para *Giardia spp* osciló principalmente de 55 % a 98.1 % y solamente uno de esos seis estudios presentó un porcentaje bajo.

Al mismo tiempo observamos un porcentaje de recuperación para *Cryptosporidium spp* mediante el método de filtración fluctuando entre 25 % llegando a 85.7 %

[Anexo 19]

Gráfico 2
Porcentaje de recuperación de *Cryptosporidium* y *Giardia* mediante el método de centrifugación.



Fuente: Tabla 6.

En el gráfico número 2 observamos que de los 15 estudios analizados, 5 de ellos emplearon como método principal (sin ser acompañado por filtración) para la concentración de parásitos la **centrifugación**.

En el gráfico se compara el porcentaje de recuperación que éste método obtuvo para *Giardia spp*, el cual oscila entre 20 % hasta 65.2 %

A la vez, en el gráfico número 4 comparamos que el porcentaje para recuperar *Cryptosporidium spp* mediante la centrifugación fluctúa desde un 21.2 hasta llegar al 100 %

[Anexo 19]

ANÁLISIS

Según los datos expresados en la tabla de resultados, y según los hallazgos de cada investigación, se puede inferir que:

De manera general, en promedio, el volumen de muestra apropiado para el procesamiento de ésta ha de ser de aproximadamente 10 L; en la mayoría de los estudios, se decidió transportar la muestra en cadena de frío, respecto a esto, y, a menos que el objetivo del análisis del agua no sea meramente parasitológico (pudiendo ser éste bacteriológico), se considera necesario mantener el almacenamiento en refrigeración; la temperatura ambiente no afecta el ciclo de reproducción de *Giardia lamblia* (quiste) y *Cryptosporidium spp* (ooquiste), y éstos pueden mantener su viabilidad a 8 °C a 20 °C. Además de que gracias a su enquistamiento, su pared rígida rica principalmente en glicoproteínas les protege del exterior. Debido a ello, el mantenimiento de la muestra a temperatura ambiente, no conllevaría al riesgo de sesgos en los hallazgos de la muestra, cuando ésta está destinada únicamente para el análisis de éstos parásitos.

En relación a los objetivos planteados en ésta investigación, se interpreta que:

- De los 15 estudios analizados, 6 de ellos (estudios: 1, 3, 6, 11, 14 y 15) emplearon como método para concentrar las muestras la **filtración**, acompañada en algunos casos principalmente por la centrifugación; 5 de estos 6 estudios que utilizaron la filtración obtuvieron porcentajes de recuperación de parásitos que llegan al 98.1 %, mientras que uno de ellos obtuvo menor porcentaje de recuperación, estos porcentajes son conforme

el número de muestras analizadas, según cada investigación. A demás 5 de esos 15 estudios (4, 5, 7, 8 y 13) emplearon como método de concentración solamente la **centrifugación**, obteniendo porcentajes de recuperación de parásitos que oscilaban entre el 50 al 100 %. También otros 3 de los 15 estudios (2, 10 y 12) utilizaron como método de concentración la floculación, obteniendo porcentajes de recuperación de parásitos según la cantidad de muestras analizadas, que fluctuaban de 25 % a 77.7 % Y nada más un estudio de los 15 analizados (9) empleó el método de flotación, y obtuvo recuperación de un 100 % [Anexo 19].

Por lo anterior, se infiere que el método idóneo para obtener una adecuada concentración de la muestra de agua es la filtración por membrana y la centrifugación, ello debido a los altos porcentajes de recuperación parasitaria reflejada según las cantidades de muestras analizadas en cada investigación de los artículos presentados.

También se debe mencionar que teóricamente la capacidad de recuperación de formas parasitarias para cada método correspondiente: la eficiencia de recuperación de parásitos, expresado en porcentaje para la centrifugación es de 37 a 84 %; la floculación con carbonato de calcio es de 69 %; ultrafiltración de 68 – 81 %; filtración junto a separación inmunomagnética 49-73 %; además la flotación tiene una sensibilidad del 97.8% de *Giardia spp* (MEKARU, S. R. 2007).

Según los hallazgos recientemente planteados, podemos analizar lo siguiente:

- La centrifugación es un método sumamente accesible y de bajo costo, y se emplea para el hallazgo de la mayoría de las formas parasitarias; la desventaja que tienen con respecto a los de

flotación es que a veces la observación microscópica puede dificultarse por la presencia de la concentración de restos no parasitarios

- La filtración con membranas de poro no mayor al de 2 micras de diámetro, son útiles para la retención y ulterior procesamiento del filtro ya sea para *Cryptosporidium* y *Giardia*, esto debido a que tamaño del ooquiste oscila de 2 a 5 μm y del quiste 10 μm de longitud, respectivamente para cada protozoo. Filtrando las muestras se asegura la retención de estos parásitos sobre la membrana.

- Floculación consiste en la combinación de reactivos para aumentar la densidad de los parásitos de manera que éstos precipiten, es un método casi desconocido, debido a que usualmente es empleado para separación de minerales; sin embargo se ha adaptado a las necesidades del laboratorio.

- Flotación, es un método basado en el empleo de un medio líquido, como solución fenolada azucarada (Sheather) y solución acuosa de ZnSO_4 (flotación con sulfato de zinc) que son soluciones más pesado que los protozoos; la ventaja de estos métodos es que producen una separación más limpia, que se encontrará en la superficie la muestra, comparada con el sedimento producto de la centrifugación; la desventaja es que la película puede desaparecer o mezclarse por movimientos bruscos del preparado y que dicho preparado debe ser analizado al instante, ya que la película tiende a desaparecer.

 En cuanto a la técnica para la identificación más adecuada, según la frecuencia del empleo y el porcentaje de sensibilidad y especificidad estándar de cada prueba, se

considera que la inmunofluorescencia y PCR son las técnicas idóneas para la identificación de *Cryptosporidium spp* y *Giardia lamblia*. [Tabla 4]

Según (Calchi, 2014) la sensibilidad y especificidad para el examen directo es de 83 % y 100 % respectivamente, aunque varía mucho según la experiencia del analista; para la tinción de Kinyoun hay una sensibilidad y especificidad elevada cuando se busca *Cryptosporidium*; mientras que la inmunofluorescencia (Merifluor *Cryptosporidium-Giardia*) es de 100 % de sensibilidad y de 100% especificidad. (Meridian, 2018).

Analizando cada metodología para la identificación de parásitos:

- Examen directo y las tinciones comprende el método más sencillo y el de menor coste, debido a que todo laboratorio cuenta con un microscopio óptico. La desventaja principal es que depende de la experiencia del analista y de la calidad del microscopio la identificación de las formas parasitarias.

- La inmunofluorescencia se trata de un inmunoensayo, que aprovecha la alta especificidad de un anticuerpo marcado, para unirse a una molécula blanco, en nuestro caso, se trata de *Cryptosporidium* y *Giardia*. Es una técnica muy ventajosa al lado de las anteriores, debido a la gran especificidad del anticuerpo marcado. La desventaja primordial radica en: el alto costo de las pruebas, sin embargo hay que indicar que, en términos monetarios, para el estado, tan solo el tratamiento para la criptosporidiasis y giardiasis oscila entre los \$25° a \$50° (Sistema Nacional de Protección al Consumidor, 2012) por paciente, sin contar con los pacientes inmunodeficientes que contraen estas patologías; es por ello que la relación costo-beneficio de

esta prueba se ve justificada, ya que en el LNR se cuenta con el microscopio de inmunofluorescencia, cuyo valor oscila entre \$14000 a \$16000, así que la inversión sería en los sets de reactivos que más adelante se presentan en la tabla 7.

-También una prueba cuya sensibilidad y especificidad es del 100 % es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una prueba molecular, que a partir de un fragmento (molde) de ADN particular, se obtienen un gran número de copias del mismo. Su ventaja, es simple, con una cantidad mínima de muestra, en la cual se encuentre una cantidad reducida del agente que se busca, podrá ampliar su ADN e identificarlo. Su desventaja, al igual que la inmunofluorescencia, su elevado coste. Sin embargo, y al igual que el beneficio planteado para el anterior, es ventajosa para el país su implementación para la búsqueda de estos parásitos. La inversión que se llevaría a cabo es la compra del primer o cebadores, cuyo valor oscila entre los \$90 a \$100.

[Anexo 20]

- Finalmente, según las necesidades del LNR, y en cuanto a la relación costo beneficio para la población, el emplear la combinación de métodos para concentrar los protozoos sería útil, por ejemplo filtrar las muestras para su ulterior centrifugación, y para la identificación de los protozoarios, sería ideal emplear técnicas como inmunofluorescencia o PCR.

Por lo tanto, y según la hipótesis planteada, ésta se rechaza, ya que se ha deducido que para abastecer los requerimientos del Laboratorio Nacional de Referencia y para cubrir las necesidades de salvaguardar la salubridad del agua para consumo en múltiples regiones de El Salvador, es necesario emplear la combinación de metodologías, para la concentración de los

parásitos y los de importancia en éste estudio: quistes de *Giardia lamblia* y ooquistes de *Cryptosporidium spp*, diferentes, a las ya empleadas desde 2002 por el LSMA (centrifugación y examen directo). Las metodologías propuestas son la combinación de la filtración de las muestras a través de membranas de poro menor a 2 micras de diámetro seguida por la sedimentación de la muestra filtrada, que contribuirán a mayor posibilidad de concentrar a estos protozoarios, y para la correcta identificación de estos es necesario la implementación de técnicas que se caractericen por alta sensibilidad y especificidad, como inmunofluorescencia y la reacción en cadena de la polimerasa, siguiendo instrucciones del fabricante de las pruebas para la identificación de los protozoos.

CONCLUSIONES

Basándose en los hallazgos obtenidos en este estudio, y el anterior análisis de los mismos, se concluye que:

El método para la concentración de parásitos más eficaz, no es solamente uno, si no la combinación de dos o más de ellos, por su facilidad y alcance, la técnica de filtración por membrana es muy útil y eficaz al procesar la muestra, ya que nos estamos asegurando que, sobre el filtro solamente queden partículas o microorganismos con el tamaño según el poro del filtro, por ello es muy efectivo. La filtración de las muestras a través de una membrana ya sea esta de policarbonato o de nitrato de celulosa cuyo poro sea no mayor de 2 micras para la retención de los protozoarios de interés; posterior a ello emplear la centrifugación de material filtrado de dicha membrana o el lavado de ella con Tween 80 al 0.1 %, la centrifugación puede oscilar entre 2500 a 3000 rpm de 5 a 15 minutos, se ha seleccionado ésta técnica debido a que cualquier laboratorio cuenta con el equipo tan esencial que es la centrifugadora, como ventaja presenta que la muestra sometida por este proceso puede ser analizada, ya sea de inmediato, o bien, almacenarse para un posterior análisis al día siguiente. Recordemos que es una técnica de separación que se utiliza para concentrar partículas suspendidas en un líquido aprovechando la diferente velocidad de desplazamiento según su forma, tamaño o peso al ser sometidas a la fuerza centrífuga.

No se ha seleccionado método de flotación para uso potencial en el LNR, debido a que conlleva complicaciones debido a la delicadeza que hay que tener con la muestra luego del procesamiento de ella a través de este método, ya que la película que se forma en la superficie

y que es la que contiene a las formas parasitarias, puede desaparecer o mezclarse por movimientos bruscos del preparado y que dicho preparado debe ser analizado al instante, ya que la película tiende a desaparecer; esta desventaja no se presenta cuando se analizan muestras de materias fecales probablemente a la diferencia de la densidad de ella, ya que están presentes en mayor cantidad de detritos; sin embargo, con las muestras de agua el riesgo a mezclar el sobrenadante es mayor, además de que el montaje de estos para ser analizada debe ser inmediato.

En cuanto a la identificación, es indudable que la inmunofluorescencia junto al PCR son las técnicas más específicas y más sensibles, a pesar de su coste, el beneficio tanto para la población, el estado y del laboratorio es mayor, ya que al identificar los parásitos, se llevarían a cabo medidas profilácticas hacia la población, como también el tratamiento del cuerpo de agua que se encuentre infectado con los protozoarios evitando de esa forma brotes en la población.

RECOMENDACIONES

Debido a los hallazgos del presente estudio, se sugiere que al procesar una muestra en el LNR:

- ☑ Cantidad de muestra óptima: 10 L en frasco ámbar, transportado en cadena de frío.
- ☑ Métodos para la concentración sugeridos: filtración, centrifugación y sedimentación espontánea.
- ☑ Técnicas para la identificación: inmunofluorescencia y reacción en cadena de polimerasa.

Para la concentración de la muestra:

- 📄 Aproximadamente 250 mL a 500 mL de cada muestra, concentrarla por **filtración** a través de filtros de membrana de policarbonato o acetato de celulosa de aproximadamente 50 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*.

Si se desea recuperar una mayor cantidad de sedimento para asegurar mayor número de formas parasitarias; adicionalmente al filtro:

- 📄 Lavar el filtro con Tween 80 al 0.1% - 0.2 % mediante agitación, colocando el filtro dentro de una caja de Petri de 10 cm de diámetro, de esa manera se desprenden las sustancias coloides de interés del filtro. De no disponer de Tween 80, se sugiere lavar el filtro con agua destilada.
- 📄 **Centrifugar** el lavado a 3000 rpm de 5 a 10 minutos.

 Se aconseja dejar el centrifugado en su respectivo tubo en un área libre de vibraciones, a temperatura ambiente toda la noche (Técnica de Sedimentación Espontánea en Tubo).

De esta manera se obtendrá una mayor sedimentación de la muestra.

 Filtrar nuevamente el sedimento.

Para la identificación de los protozoarios:

Ⓢ Colocar una gota del sedimento obtenido a través de la **técnica de sedimentación espontánea en tubo**, observarla al microscopio mediante examen al fresco.

Ⓢ La técnica de Inmunofluorescencia directa, se puede llevar a cabo empleando los anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína: A300FL Giardia-a- Glo™ (Waterboinc, INC) para la determinación de *G. lamblia*; y A400FL Crypto- a- Glo™ (Waterboinc, INC) para la de *C. parvum* o kit de Merifluor [anexo 22]

 Una vez filtradas las muestras se agrega sobre el filtro 30 µl del anticuerpo respectivo y se incuba en oscuridad el filtro a temperatura ambiente durante 30 minutos.

 Posteriormente se lava el exceso de fluorocromo con buffer fosfato salino (PBS) y se monta en portaobjetos para la visualización al microscopio de inmunofluorescencia. (recordar seguir instrucciones del fabricante).

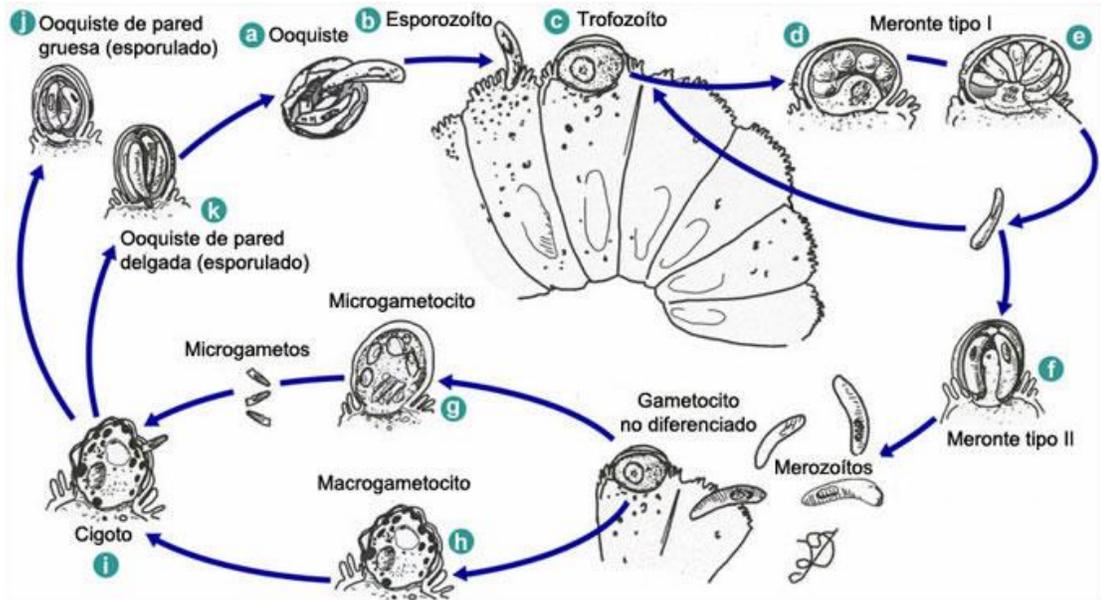
Ⓢ Mediante la técnica de PCR: seguir instrucciones del fabricante.

Al realizar la lectura de FTM, la ausencia de coliformes sean estos totales o fecales, no indican que los protozoarios de interés no estén presentes, es ideal analizar las muestras mediante las técnicas de inmunofluorescencia y/o PCR, primordialmente aquellas que provengan de regiones reconocidas por el MINSAL por su incidencia o prevalencia de giardiasis y / o criptosporidiasis.

Como recomendación adicional, se sugiere incentivar y orientar a los pobladores de las comunidades que utilizan agua de pozo como fuente de consumo, emplear como método para la desinfección adicional a la cloración: hervir el agua que utilizaran para consumo, filtrarla a través de filtros caseros o comerciales. De esa manera se asegura la eliminación tanto de bacterias y parásitos entéricos.

ANEXOS

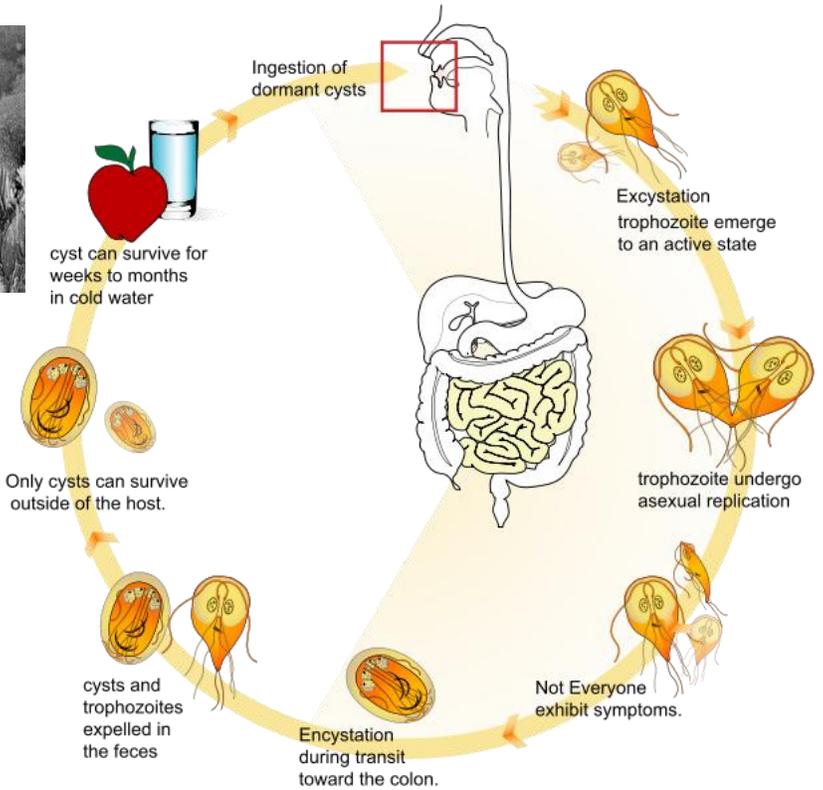
Anexo 1



Anexo 2



Anexo 3



Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú

Toma de muestra: Las muestras se tomaron utilizando frascos de vidrio y plástico de uno a tres litros de capacidad y convenientemente etiquetados. Posteriormente fueron trasladadas al laboratorio en neveras con hielo y conservadas a 4 °C. De cada punto de muestreo se recogió un total de 20 litros.

Concentración de la muestra: Las muestras de agua fueron filtradas a través de filtro de acetato de celulosa de 0,2 µm de tamaño de poro utilizando una bomba de aspiración portátil. Los filtros se fueron renovando en el momento que empezaban a obstruirse y se comenzaba a interrumpir el filtrado. Tras el filtrado, cada filtro fue cortado en tiras de 0,5 cm de ancho que se depositaron en placas Petri de 10 cm de diámetro para su lavado con 50 mL de Tween 80 (0,1 %), mediante agitación. El lavado era filtrado por doble gasa y colador y después centrifugado por diez minutos a 3 000 rpm. A continuación se procedió a concentrar la muestra por flotación mediante solución de Sheater.

Identificación de parásitos: El sedimento fue resuspendido en 0,5 mL de solución salina fisiológica (NaCl 0,85%), observado directamente al microscopio óptico y se tiñeron varias láminas tanto con Giemsa como con Ziehl-Neelsen, también para su observación. El producto obtenido de la concentración se observó al microscopio óptico por examen directo y tras tinción de Ziehl-Neelsen modificado y Giemsa.

Resultados: son muchos los parásitos que se han identificado en agua, entre ellos *Giardia lamblia*, *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium spp.* y *Balantidium coli*. Es destacable que los tres protozoos patógenos *G. lamblia*, *C. cayetanensis*, y *Cryptosporidium spp.* Estuvieron presentes en el agua analizada y sin embargo no se encontraron ni huevos ni larvas de helmintos. (Pérez, 2008).

Identificación de parásitos intestinales en agua de pozos profundos de cuatro municipios. Estado Aragua, Venezuela. 2011-2012

Toma de muestras: Las muestras de agua fueron recolectadas en envases de 20 litros de capacidad, boca ancha, con tapa hermética y previamente esterilizados.

Concentración de la muestra: método de floculación: Las muestras fueron trasvasadas a envases plásticos de 21 litros de capacidad identificados para ser procesados por el método de floculación, el cual consiste en una combinación de reactivos, que aumentan la densidad de los parásitos de manera que éstos precipiten. Luego se extrajo el sobrenadante de cada tubo y se realizó una mezcla del mismo punto de muestreo, se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones descritas anteriormente.

Identificación de parásitos: A las muestras se le aplicaron los métodos de: tinción de Kinyoun y examen directo (Solución salina fisiológica, lugol).

Resultados: Se observó la presencia de parásitos intestinales en 37,5 % de las muestras procesadas (21/56 pozos muestreados), siendo variable para cada municipio estudiado.
(Gallego, 2012)

***Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en aguas crudas y tratadas del estado Bolívar, Venezuela**

Toma de muestra: Se analizaron muestras de agua potable: aquella destinada al consumo humano que cumple con los requisitos exigidos por la autoridad sanitaria competente; aguas crudas: aquellas provenientes de fuentes naturales; y aguas tratadas las que han sido sometidas a uno o varios procesos físicos o químicos para su adecuación como agua potable. Las muestras fueron tomadas en recipientes de vidrio estériles y protegidas con papel alrededor del cuello de la botella con una capacidad 3.000 ml - 4.000 ml. En la muestra de aguas tratadas, por cada 100 cc de agua se le añadió 0,1 de tiosulfato de sodio, que detiene la acción bactericida del cloro.

Concentración de la muestra: Se realizó filtración de las muestras de aguas según normas COVENIN, la separación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* y quiste de *Giardia lamblia* por el Método de Concentración Agua Éter.

Identificación de parásitos: La detección de ooquistes *Cryptosporidium parvum* y quistes de *Giardia lamblia* se realizó mediante el método de detección de anticuerpos monoclonales inmunofluorescentes de MeriFluor C/G® (Meridian Diagnostic Inc), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizaron controles positivos y negativos cada vez que se analizaron las muestras. *Giardia lamblia* y *C. parvum* fueron identificados por su aspecto morfológico y tamaño evidenciándose con verde-manzana fluorescente a la microscopía.

Resultados: Se procesó un total de 21 muestras de aguas: 7 antes de tratamiento físico-químico (aguas crudas) y 7 después del mismo (aguas tratadas), además 7 de los pozos de consumo

humano (aguas crudas). Se demostró en un 85,7% (n=6) la presencia de *Cryptosporidium parvum* y en el 71,4% (n=5) de *Giardia lamblia*.

En las muestras de los pozos el 28,5% (n=2) presentó simultáneamente ambos parásitos. Después del tratamiento físico-químico (salida del agua para el consumo humano) se observó la presencia de *C. parvum* y *Giardia lamblia* en 14,3% (n=1). (Julman, 2008)

Anexo 7

Occurrence of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium sp.* in wastewater samples from São Paulo State, Brazil, and Lima, Perú

Sao Pablo

Las muestras del Estado de São Paulo utilizadas en este estudio pertenecen al Programa de Vigilancia y Control de *Vibrio cholerae* en agua y alcantarillado, llevado a cabo por la Compañía Ambiental del Estado de São Paulo (CETESB)

Toma de muestra: 23 sitios de recolección, mediante una mecha de gasa (método de hisopo de Moore), (Moore et al., 1952) - en cada ubicación, quitándola después de un período de 7 días y almacenándola en bolsas de plástico estériles. Se tomó un volumen de 50 ml, se almacenó bajo refrigeración. Concentración de la muestra: se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 ° C para concentrar los oocistos de *Cryptosporidium* y los quistes de *G. intestinalis*. La suspensión se almacenó finalmente a -20 ° C para la posterior extracción de ADN genómico. (Ulloa, 2016)

Anexo 8

Occurrence of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium sp.* in wastewater samples from São Paulo State, Brazil, and Lima, Perú

Lima, Perú

Toma de muestra: Para los muestreos de aguas residuales de Lima, Perú, la recolección (aproximadamente 150 ml) se llevó a cabo en dos sitios.

Concentración de la muestra: Las muestras se procesaron el mismo día de la recolección y se concentraron en centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos sin un proceso de clarificación

adicional. Los sobrenadantes se descartaron y el sedimento se transfirió a microtubos de 2 ml y finalmente se almacenó a una extracción de ADN genómico de 20 °C.

Resultados: Treinta y tres muestras de aguas residuales fueron recolectadas en diferentes sitios y períodos de 2012 y 2013. El protozoo *Cryptosporidium* fue detectado en 36.4% (12/33) y *G. intestinalis* en 63.6% (21/33) de todas las muestras. En el estado de Sao Pablo, *Cryptosporidium* fue detectado en 21,2% (7/33) de acuerdo con los resultados de la PCR, a la vez *G. intestinalis* fue identificada en 65.2% (15/23) de muestras de aguas residuales por la re-amplificación de productos de PCR. Los resultados de genotipado del presente trabajo demostraron la presencia de *C. hominis* y *C. cuniculus* en muestras brasileñas de aguas residuales. El ensamblaje A de *G. intestinalis* se identificó en el 38.1% (8/21) y el ensamblaje B en el 28.6% (6/21) de las muestras positivas. Con respecto a las muestras de aguas residuales de la ciudad de Lima, el 50% (5/10) fueron positivas para *Cryptosporidium spp.* Las muestras positivas de *G. intestinalis* representaron el 60% (6/10) del total recolectado, perteneciendo tanto al distrito periurbano como al urbano. El análisis genotípico reveló la presencia de *C.hominis*, *C. cuniculus* y *C. muris* en las muestras positivas. Se identificó el ensamblaje A de *G. intestinalis* en el 19.1% (4/21) y el ensamblaje B en el 9.5% (2/21) de las muestras positivas. (Ulloa, 2016).

Gastrointestinal diseases and causal effects in the Valle de Juárez, Chihuahua, México.

Toma de muestra: El muestreo consistió en coleccionar 15 litros de agua en un recipiente de plástico previamente desinfectado, el cual se etiquetó con información del sitio de muestreo, tipo de muestra, fecha, nombre de la persona que realizó el muestreo y se midió la temperatura al momento del muestreo. La muestra se colocó en una hielera, para transportarse al Laboratorio y se mantuvo en un cuarto frío a 4 °C, previo a su análisis para evitar el crecimiento de las poblaciones microbianas que fueron analizadas.

Concentración de muestra: La técnica está basada en la concentración de diez litros de agua por ultrafiltración y la separación inmunomagnética de quistes de *Giardia lamblia* y ooquistes de *Cryptosporidium parvum*.

Identificación de parásitos: Por inmunofluorescencia, para la identificación de los parásitos al microscopio de fluorescencia con base en el método 1623 de la agencia de Protección ambiental de estados Unidos.

Resultados: Los resultados muestran el 55% de las muestras positivas por lo menos a uno de los parásitos o a los dos. El rango fue entre 0 y 35 ooquiste o quistes de ambos parásitos. Éstos organismos, además de ser parásitos, se utilizaron como indicadores de contaminación fecal, debido a su gran resistencia en el agua, sobre todo *Cryptosporidium parvum*, que dura meses, por lo que, de acuerdo con la literatura, su número en el agua potable debe ser cero (Harter, 2007). Los (oo) quistes de estos parásitos, resisten a condiciones extremas (físicas y químicas) del ambiente, incluso el cloro, excepto las temperaturas por arriba de los 70 °C (Flores, 2010).

Técnicas para la detección de *Cryptosporidium sp.* en sistemas de tratamiento de agua residual

Toma de Muestras: Se tomaron muestras de 4 litros de agua residual en recipientes plásticos previamente desinfectados, y se trasladaron al laboratorio en una cava con hielo para su procesamiento inmediato.

Concentración de las muestras: Una vez en el laboratorio, el envase que contenía los cuatro litros de muestra, se dejó en sedimentación por 24 horas, se descartó el sobrenadante por succión, y se recuperó el sedimento más aproximadamente, 2 ml del sobrenadante. Este volumen se distribuyó en botellas de 200 ml de capacidad y se centrifugó a 2500 x g durante 11 min. Al terminar la centrifugación, se eliminó el sobrenadante mediante succión y los sedimentos de cada botella fueron transferidos a un único tubo de centrífuga de 50 ml siendo preservados en 10 ml de dicromato de potasio al 2,5% y almacenándose a 4°C hasta su visualización.

Identificación de Parásitos: La visualización de *Cryptosporidium sp.* se realizó por las técnicas de tinción de Kinyoun, e Inmunofluorescencia directa (Waterborne, INC. New Orleans, USA).

Resultados: Los resultados obtenidos en esta investigación muestran la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium sp.* en el 100% de las muestras de agua residual analizadas por ambas técnicas.

El promedio de ooquistes de *Cryptosporidium sp.* detectados por la técnica de Kinyoun fue de $4,9 \times 10^5$ ooquistes/100L en la entrada, $1,2 \times 10^5$ ooquistes/100L en los módulos primarios,

5,9x10⁴ ooquistes/100L en las lagunas facultativas y 3,0x10⁴ ooquistes/100L en la salida del sistema de lagunas.

Mientras que por la técnica de microscopía de inmunofluorescencia directa el promedio de ooquistes de *C. parvum* detectados fue de 8,1x10⁵ ooquistes/100L en la entrada, 3,0x10⁵ ooquistes/100L en los módulos primarios, 1,4x10⁵ ooquistes/100L en la laguna facultativa y 7,7x10⁴ ooquistes/100L en la salida. (Arnedo, 2008).

Protozoarios en aguas superficiales y muestras fecales de individuos de poblaciones rurales del municipio Montes, estado Sucre, Venezuela

Toma de muestra: En cada zona de muestreo se recolectaron 25 muestras de agua en total, cada una de 5 litros, tomadas a 20 cm por debajo de la superficie del agua a contracorriente y a 2 m desde la orilla; las muestras fueron colectadas en envases plásticos transparentes, limpios y con tapa de rosca, previamente

Concentración de muestra: Las muestras de aguas se dejaron reposar durante un período de 48 horas. Se descartaron 4800 mL, el sedimento (200 mL) se agitó y se transfirió en alícuotas en tubos plásticos de 15 mL. Se realizaron procedimientos de sedimentación por centrifugación, floculación y tinciones, por triplicado, como se describe a continuación: Primeramente, las alícuotas de agua se centrifugaron a 1006 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante con pipeta Pasteur, se tomó una gota del sedimento y se colocó una en cada extremo de una lámina portaobjeto. Luego, se colocó una gota de disolución de Lugol sobre una de las gotas de sedimento y se cubrió la preparación con laminilla, se observó al microscopio con objetivos de 10X y 40X para la búsqueda de las formas evolutivas de los parásitos. En segundo lugar, se tomó una alícuota de agua superficial y se mezcló en partes iguales con solución salina fisiológica.

Se filtró la preparación a través de gasa. Se agitó enérgicamente y luego se dejó en reposo de 30 a 45 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se colocó en lámina portaobjeto para ser observado con objetivos de 10 y 40X. En tercer lugar, una porción de 25 mL de cada muestra de agua superficial, fue sometida a un proceso de floculación

Posteriormente se dejaron sedimentar por 24 horas, se retiró el sobrenadante y se recuperó en tubos de centrifuga con capacidad de 15 mL. El sedimento se centrifugó a 3000 g por 10 minutos, se realizaron lavados con PBS hasta obtener un pH final de 7,4. Las preparaciones se almacenaron en nevera a 4°C hasta su montaje y observación microscópica

Identificación de parásitos: Finalmente, una gota de cada preparación fue colocada en dos láminas portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego fueron teñidas con las coloraciones de Kinyoun y Tricrómica: utilizadas para teñir los ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, *Isospora belli* o *Cyclospora cayetanensis* y para la tinción de la morfología nuclear de protozoarios intestinales, respectivamente. (Mora, 2010)

El agua subterránea como agente transmisor de protozoos intestinales

Toma de muestra: Las muestras fueron recolectadas y procesadas filtrando alrededor de 4 000 litros de agua provenientes de perforaciones y tanques comunitarios de cada uno de los grupos de población A, B y C y de la red de distribución de agua potable del grupo D, a través de filtros de hilo de polipropileno tejido, con una porosidad nominal de 1 micrómetro y un flujo de 15-20 litros por minuto. Finalizada la filtración, cada uno de los filtros fue remitido al laboratorio, en doble bolsa de polietileno y refrigerado con hielo húmedo. Concentración de muestra: Dentro de las 48 horas siguientes y trabajando de manera aséptica, se desmenuzaron minuciosamente, lavando cada porción obtenida con una solución de Tween 80 al 0,2% (sustancia tensoactiva caotrópica, que interrumpe las interacciones hidrofóbicas que constituyen un importante factor de adhesión de los quistes a las fibras del filtro, facilitando su atrapamiento físico). Todo el líquido de lavado (2 litros), se centrifugó a 3 000 rpm, durante 10 minutos, descartándose el sobrenadante. Los sedimentos fueron resuspendidos en 1 ml de formaldehído al 3,7%. Todas las muestras fueron concentradas usando las técnicas de flotación con sulfato de zinc y con la solución de Sheather

Identificación de parásitos: La búsqueda de los parásitos se realizó mediante exámenes microscópicos directos en fresco, utilizando lugol, coloraciones vitales (colorante de Taranto) y coloraciones permanentes y diferenciales (tricrómica, Ziehl Nielsen y Kinyoun).

Los exámenes realizados fueron evaluados desde el punto de vista cualitativo, habiéndose consignado presencia o ausencia de parásitos. (Lura, 2002)

Agua residual. Recuento y determinación de viabilidad de *Giardia spp.* y *Cryptosporidium spp.* En aguas potables y residuales en la cuenca alta del río Bogotá.

Toma de muestra: Las muestras se tomaron utilizando un muestreador metálico con un soporte al extremo donde se insertaba un frasco de plástico, el cual se sumergía boca abajo, aproximadamente, 20 cm por debajo de la superficie del agua a contracorriente y a 3 m de distancia de la orilla

Los 10 litros de agua recolectados se almacenaron en un garrafón de plástico y se transportaron al laboratorio para ser procesados el mismo día.

Concentración de la muestra: Técnica de floculación inorgánica para recuperación y recuento de formas quísticas a partir de agua residual. Como paso adicional, se lavaron los garrafones con 200 ml de ácido sulfámico al 10%, 50 ml de PBS, pH 7,4, y 50 ml de Tween 80 al 0,01% para desprender de las paredes cualquier partícula adherida, y el producto de este lavado también se dispuso en los tubos de centrifuga. El sedimento se centrifugó a 3.000 g por 10 minutos y se recuperó la mayor cantidad de sedimento en un solo tubo por muestra, haciendo lavados con PBS hasta obtener un pH final de 7,4. Las muestras concentradas se almacenaron en nevera a 4°C hasta su montaje y la lectura. (Alarcón, M, 2007)

Agua potable: Recuento y determinación de viabilidad de *Giardia spp* y *Cryptosporidium spp*. en aguas potables y residuales en la cuenca alta del río Bogotá.

Toma de muestra: Las muestras de agua potable se tomaron directamente del tanque de almacenamiento del agua de entrada y de salida de cada una de las plantas potabilizadoras estudiadas. Se utilizaron garrafones de plástico con capacidad de 20 litros

Concentración de la muestra: Técnica de filtración para recuperación y detección de *Giardia spp.* y *Cryptosporidium spp.* a partir de aguas potables, propuesta por la EPA, método 1623. A continuación, se centrifugó a 1.100 g por 15 minutos descartando el sobrenadante 1 cm por encima del sedimento y reuniendo todo el sedimento en un solo tubo. Después de esto, se tomaron 2,5 mL del sedimento con 5 mL de Percoll-sacarosa, densidad=1,1 (45 ml de Percoll y 10 ml de sacarosa, 2,5 M, por 100 ml de agua destilada) y se centrifugó a 540 g por 10 minutos, lo cual resultó en la formación de tres fases. La interfase, en la cual se encontraban las formas quísticas, se depositaba en otro tubo de centrifuga y se le lavaron con PBS centrifugando a 2.790 g por 15 minutos. Las muestras concentradas se almacenaron en nevera a 4°C hasta el montaje y la lectura.

Identificación de parásitos: Técnica de colorantes vitales con DAPI e IP, propuesta por Campbell et al. y Thiriat et al. Las muestras concentradas a partir de agua residual y potable se sometieron a un procedimiento de marcación con colorantes vitales DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) e IP (yoduro de propidio). Para esto, se mezclaron 100 µl de cada muestra con 900 µl de reactivo HBSS (tampón de Hank a pH 2,87) durante 1 hora a 37°C. A continuación, las muestras se

centrifugaron y lavaron dos veces con PBS a 14.000 rpm por 30 segundos (17). Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 10 µl de DAPI y 10 µl de IP en cada tubo, incubando las muestras a 37°C durante 2 horas en la oscuridad. Finalmente, se lavaron las muestras con 900 µl de PBS, pH 7,2, centrifugando a 14.000 rpm por 30 segundos; de cada muestra marcada con colorantes vitales, se realizó la técnica de inmunofluorescencia, Marcación con estuche comercial Merifluor® Meridian. (Alarcón, M. 2005)

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

Toma de muestras: Para la detección de parásitos en las muestras, se tomaron volúmenes de 20 L en botellas de polipropileno estériles desinfectadas. 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. Una vez que se filtró el volumen de agua requerida, se extrajo el filtro y se colocó en una bolsa con cierre hermético. Todas las muestras se colocaron en una cava con hielo y se trasladaron al laboratorio para su inmediato procesamiento.

Concentración de la muestra: las muestras de agua provenientes de FS fueron procesadas empleando las técnicas de floculación con carbonato de calcio y formol-éter.

Identificación de parásitos: La visualización y cuantificación de los parásitos protozoarios entéricos se realizó mediante: examen al fresco con solución salina fisiológica al 0,85% y coloración temporal con lugol para la observación de *Giardia sp*; coloración de Kinyoun para la observación de *Cryptosporidium sp*, e Inmunofluorescencia directa (Waterbo inc, INC) para la cuantificación de las especies de *G. lamblia* y *C. parvum*. Las muestras se procesaron junto con controles negativos de buffer fosfato salino estéril, y con 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.

Resultados: se detectó mediante la técnica de inmunofluorescencia 14 (53.8 %) de positividad para la presencia de *G. lamblia*, con un rango entre 2 y 75 quistes/L, y una media de 24 quistes /

100L; y 20 (77 %) para la presencia de *C. parvum*, en un rango entre 1 y 75 ooquistes/100L con una media de 21 ooquistes/100L. (Bracho, 2007).

Anexo 16

***Cryptosporidium spp* y otros enteroparásitos en aguas Recreacionales de la Represa horizonte. Upata, estado Bolívar**

Toma de muestras: Las muestras de aguas crudas fueron recolectadas en recipientes de plásticos, con capacidad de 5L y esterilizadas a 120°C por 15 minutos, protegidas con papel estéril alrededor del cuello de la botella, el promedio de agua recolectada por recipiente fue de 4L.

Procedimiento para la recolección de muestras de agua cruda de acuerdo a las normas COVENIN: captación manual, directamente de la fuente de agua, a 50 cm de profundidad, evitando residuos vegetales y espuma de la superficie y la toma de temperatura del agua. Luego fueron rotuladas, con localización y código, para ser almacenadas a temperatura ambiente, y trasladadas al laboratorio.

Concentración de la muestra: Se tomó una alícuota de 10 mL y se vertió en un tubo cónico, para posteriormente ser centrifugado a 1500 rpm por 25 min. También se realizó la técnica de sedimentación espontánea durante 24 horas, empleando 20 mL de muestra. Luego se filtró la totalidad de la muestra recolectada.

Identificación de parásitos: Examen directo con solución salina 0.85% y lugol (de alícuota de 10 y 20 mL) Se realizaron 4 láminas portaobjetos con la muestra colocando una gota de sedimento

en cada lámina, dejando secar y reservando para las pruebas siguientes, dos láminas se destinaron a la técnica de Kinyoun y 2 láminas a la técnica de inmunofluorescencia.

Los ooquistes se observaron tenidos de color rojo brillante sobre fondo azul. Son redondeados de 3 a 5 micras de diámetro en el caso de *Cryptosporidium*, de 8 a 12 micras. Inmunofluorescencia para diagnóstico en Agua de *Cryptosporidium* y *Giardia* Meryfluor, la positividad se evidenció por la presencia en fondo oscuro de estructuras de coloración naranja a verde con dimensiones entre 3 a 7 micras para *Cryptosporidium* y estructuras verde brillante de 10 micras para *Giardia sp.* (Meridian Bioscience) Resultados: *Giardia sp* (32,50%), relación a los coccidios, se obtuvo que *Cryptosporidium spp* fue el único coccidio diagnosticado con 8 casos (20%). (Ayala, 2011)

Presencia y caracterización molecular de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua de lago recreativo en Tianjin, China: un estudio preliminar

Toma de muestra: Cada muestra se recolectó usando un recipiente de plástico de 20 L. Después de la recolección, las muestras fueron transportadas en hielo al laboratorio de inmediato.

Concentración de la muestra: los patógenos parásitos en las muestras se concentraron mediante un método de disolución del filtro de membrana. El filtro se disolvió en soluciones de acetona, seguido de centrifugación a 1.050 xg durante 10 minutos a 4 ° C.

Identificación de parásitos: Los gránulos empaquetados se resuspendieron en un volumen adecuado (2-10 ml) de agua destilada. La mitad de la resuspensión de cada muestra se utilizó para la enumeración de protozoos y la otra mitad para la extracción de ADN.

Resultados:

Las eficiencias de recuperación de las cuatro réplicas usando el método involucraron filtración, flotación, etiquetado con anticuerpo monoclonal y microscopía, oscilaron entre 32.50% y 50.83%, con una media de 41.25%, para ooquistes de *Cryptosporidium*, mientras que la tasa de recuperación promedio para quiste de *Giardia* fue 38.32%, varió de 27.01% a 47.45%.

(Xiao, 2018)

***Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms**

Toma de muestra: se colectaron muestras en dos visitas. Durante la primera visita, la recolección de agua se llevó a cabo en dos puntos de cada fuente de agua: uno en el lugar de origen del agua y el otro del grifo. Se recogieron aproximadamente 250 ml de agua en una botella estéril, para verificar la presencia de coliformes. Durante la segunda visita, la nueva recolección de agua se realizó solo en fincas que mostraron contaminación con coliformes fecales en agua.

En esta segunda etapa, realizamos una nueva recolección de agua, para el análisis de coliformes, y 10 L fueron recolectados en contenedores de plástico para la identificación de *Giardia* y *Cryptosporidium*.

Concentración: Para la concentración de las muestras de agua, 3 L de cada muestra de 10 L obtenida durante la segunda visita se filtraron a través de membranas de éster de celulosa con 47 mm de diámetro y porosidad 1,2 μm (Millipore®, Merck, Darmstadt, Alemania), en un sistema de bomba de vacío.

En muestras con alta turbidez, donde no fue posible realizar la filtración de membrana, el método de floculación de carbonato de calcio se empleó para la concentración de agua Usaron alícuotas de 10 μL de cada muestra para realizar el ensayo de inmunofluorescencia directa (IFA) utilizando el kit comercial Merifluor *Cryptosporidium* / *Giardia* (Merifluor®, Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, EE. UU.). (Santos Toledo, 2017)

Anexo 19

Tabla 5. Síntesis de los porcentajes de recuperación de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp*, según los principales métodos para la concentración según número de muestras analizadas por cada estudio: Filtración

FILTRACIÓN		
Nº de investigación	Porcentaje de recuperación de <i>Giardia</i>	Porcentaje de recuperación <i>Cryptosporidium</i>
INV1	57	29
INV3	71.4	85.7
INV6	55	55
INV11	75	25
INV14	98.1	82.7
INV15	10	10

Tabla 6. Síntesis de los porcentajes de recuperación de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp*, según los principales métodos para la concentración según número de muestras analizadas por cada estudio: centrifugación

CENTRIFUGACIÓN		
Nº de investigación	Porcentaje de recuperación para <i>Giardia</i>	Porcentaje recuperación para <i>Cryptosporidium</i>
INV4	65.2	21.2
INV5	60	50
INV7		100
INV8	20	
INV13	57	57

Fuente: tabla 2

Tabla 7

Valor aproximado de material para la realización de las técnicas de identificación de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp.*

MÉTODO	Material/equipo	PRECIO
Examen directo	Microscopio óptico	\$425 ^{oo}
	Laminas y laminillas	\$40 ^{oo}
Inmunofluorescencia	MERIFLUOR [®] <i>Cryptosporidium</i> / <i>Giardia</i>	\$1,077.29 { http://www.egeneralmedical.com/fsc-3448222.html }
	A400FLK Crypt-a-Glo™ Comprehensive Kit	Waterborne, Inc.
	A300FLK Giardi-a-Glo™ Comprehensive Kit	
	Microscopio fluorescencia	\$14,000
PCR	Cebador o Primer (Coresa SA de CV)	\$100 ^{oo}
	Equipo para procesar PCR	\$95,000
MERCKMILLIPORE	Tween 80 1000 Kg	\$84.68
	1 L	26,12\$

Fuente: según casa comercial.

GLOSARIO:

Agua potable: aquella apta para el consumo humano y que cumple con los parámetros físicos, químicos y microbiológicos establecidos en la norma salvadoreña para el agua potable. Pag 1

Agua de pozo: Del latín putĕus, un pozo es un hoyo profundo, orificio, túnel vertical o perforación que se realiza en la tierra. Dichas perforaciones se llevan a cabo, por lo general, con algún fin específico, como hallar agua subterránea

Brote epidémico, y usualmente brote, es una clasificación usada en la epidemiología para referirse a la aparición repentina de una enfermedad debida a una infección en un lugar específico.

Centrifugación: es un método por el cual se pueden separar sólidos de líquidos de diferente densidad por medio de una fuerza giratoria. La fuerza centrífuga es provista por una máquina llamada centrifugadora, la cual imprime a la mezcla un movimiento de rotación que origina una fuerza que produce la sedimentación de los sólidos o de las partículas de mayor densidad.

Cebador o primer está formado por nucleótidos de ácido ribonucleico (ARN) (éste es sintetizado por la ARN primasa), que permite que la ADN polimerasa III comience la síntesis de la nueva cadena de ADN. El cebador es la secuencia de inicio en la replicación de la cadena.

Colecistitis: Inflamación aguda o crónica de la vesícula biliar, que generalmente se produce por la presencia de cálculos.

Colelitiasis Formación o presencia de cálculos en la vesícula biliar.

Floculación es un proceso químico mediante el cual, con la adición de sustancias denominadas floculantes, se aglutinan las sustancias coloidales presentes en el agua, facilitando de esta forma su decantación y posterior filtrado.

Hipoclorito de sodio (cuya disolución en agua es conocida como lejía o cloro) es un compuesto químico, fuertemente oxidante de fórmula NaClO .

Método: procedimiento ordenado y sistemático que conduce a obtener los resultados propuestos.

Microscopio de epifluorescencia la luz que incide sobre la muestra estudiada no la atraviesa sino que el mismo lente ilumina y recibe la luz emitida por la muestra. Su funcionamiento se basa en la propiedad de fluorescencia que tienen ciertas moléculas denominadas fluorocromos.

Microscopio de fluorescencia es una variación del microscopio de luz ultravioleta en el que los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda.

Microscopio óptico es un **microscopio** basado en lentes ópticas. También se le conoce como microscopio de luz (que utiliza luz o «fotones») o microscopio de campo claro.

Técnica: es el conjunto de pasos y procedimientos específicos que guían el diseño y el manejo de los instrumentos que sirven para la generación, recolección, ordenamiento y análisis de datos.

Turbidez: es una expresión de la propiedad óptica que causa la luz al ser dispersada y absorbida al ser transmitida en líneas rectas a través de la muestra, debido a la presencia de sólidos suspendidos en el agua. Norma salvadoreña, pag 2.

REFERENCIAS

- ALARCÓN, M; BELTRÁN M; CÁRDENAS M; OTROS. Recuento y determinación de viabilidad de *Giardia spp.* y *Cryptosporidium spp.* en aguas potables y residuales en la cuenca alta del río Bogotá. Biomédica. Bogotá, Colombia. 25. 2005. 353-365.
- ARNEDO, IVONNE. Técnicas para la detección de *Cryptosporidium sp.* en sistemas de tratamiento de agua residual. SciELO-Kasmera. Maracaibo, Venezuela. V. 36 n2. Diciembre 2008.
- AYALA, A.; VALLE, K. 2011. *Cryptosporidium spp* y otros enteroparasitos en aguas recreacionales de la represa horizonte. Upata, estado bolívar. Ciudad Bolívar, Venezuela.
- BARTLETT, MARILYN S; HARPER KATHLEEN; SMITH NANCY. Comparative Evaluation of a Modified Zinc Sulfate Flotation Technique. Journal of Clinical Microbiology. USA. Vol. 7 n 6. Junio 1978. P. 524-528.
- BOTERO, D; RESTREPO, M. 2012. Parasitosis humanas. 5ta edición. Medellín, Colombia. Pag. 82-87, 98-104
- BRACHO, MARIANGELA. Presencia de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en agua potable. Ciencia. Maracaibo, Venezuela. 15(2). 2007. 164-171
- BURTIS CA, ASHWOOD ER, BURNS DE, SAWYER BG. 2008. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6^o ed. Saunders (Elsevier).
- CDC. 2015. Parasites- *Giardia*. Clifton, Road Atlanta. U.S. Department of Health & Human Services. <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/index.html> . *Giardia*.

- Dirección General de Salud Ambiental del Ministerio de Salud. 2011. Reglamento de la calidad del agua de consumo humano. 1ra. Edición. Lima, Perú. J. B. GRAFIC E.I.R.L. Pág 14-28
- DOMÉNECH. JAVIER. *Cryptosporidium* y *Giardia*, problemas emergentes en el agua de consumo humano. ELSEVIER. España. Vol. 22, núm. 11. Diciembre 2003. Pág. 112-116.
- FLORES MÁRGEZ, JUAN; RAMÍREZ LÓPEZ, ALBERTO; ENRÍQUEZ, OLVAS. 2010. Gastrointestinal diseases and causal effects in the Valle de Juárez, Chihuahua, México. Vol 5. Ciudad Juárez, Chihuahua, México. Colección reportes técnicos de investigación. Pag 30, 47-48.
- GALLEGO JARAMILLO L. M. Identificación de parásitos intestinales en agua de pozos profundos de cuatro municipios. Estado Aragua, Venezuela. 2011-2012. Rev Cubana de Medicina Tropical. Maracay, Venezuela. 66(2). 2014. 164-173
- HUGO D. LUJÁN. *Giardia* y giardiasis. Scielo. Buenos Aires, Argentina. Vol 66 n1. Febrero 2006.
- JULMAN CERMEÑO, R. *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en aguas crudas y tratadas del estado Bolívar, Venezuela. Scielo. Puerto Ordaz, Venezuela. 12(46). Enero 2008.
- KAMÍNS R. G. 2003. MANUAL DE PARASITOLOGÍA Métodos para Laboratorios de Atención Primaria de Salud. 2da edición. Tegucigalpa, Honduras. Rina Girard de Kamínsky, M.Sc. Pág. 39-41.

- LURA, MARÍA. El agua subterránea como agente transmisor de protozoos intestinales. SciELO|Revista chilena de pediatría. Santiago, Chile. V. 73 n.4. julio 2002. 415-424
- Meridian® Bioscience inc. MERIFLUOR® *Cryptosporidium/Giardia*. <http://www.meridianbioscience.com/diagnostic-products/cryptosporidium-and-giardia/merifluor/merifluor-cryptosporidium-and-giardia.aspx>. Merifluor®.
- MOE, CHRISTINE. 1992. Standard Methods for examination of water and wastewater. 18TH edition. Washington, USA. American Public Health Association. Pág. 9-125
- MOE, CHRISTINE. 1995. Standard Methods for examination of water and wastewater. 19TH edition. Washington, USA. American Public Health Association. Pág. 9-110, 9-111.
- MORA, LEONOR; MARTÍNEZ, INDIRA; FIGUERA, LOURDES; SEGURA, MERLYN; DEL VALLE, GUILARTE. Protozoarios en aguas superficiales y muestras fecales de individuos de poblaciones rurales del municipio Montes, estado Sucre, Venezuela. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Vol. 51, n 4. Maracaibo, Venezuela. 2010. 460-463.
- OMS. Vigilancia y control de los abastecimientos de agua a la comunidad. Guías para la calidad del agua potable. Ginebra, Suiza. Vol. 3 segunda edición. 1998. Pág 6-7. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41985/9243545035-spa.pdf?sequence=1>
- OMS. Recomendaciones. Guías para la calidad del agua potable. Suiza. Vol. 1, tercera edición. 2006. Pág. 13, 32-33. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/gdwq3_es_full_lowres.pdf

- PARIJA, S. C. Cryptosporidiosis: A mini review. *Tropical Parasitology*. Puducherry, India. Vol 7 (2). Julio-diciembre 2017. Pág 72-80.
- PÉREZ CORDÓN GREGORIO. Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. *Rev Peru Med. Perú*. 25(1). 2008. 144-48.
- Republica de El Salvador. Diario Oficial. Código de salud. Tomo 383, numero 109. Junio 2009. Capitulo dos. Sección ocho. Artículo 63 y 65.
- SANTOS TOLEDO, R; CARDOSO, F; PINTO, F. *Cryptosporidium spp.* and *Giardia spp.* in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms. *PLOS|ONE*. Parana, Brasil. 12(4). Abril, 2017. 1-20.
- Sistema Nacional de Protección al Consumidor. 2012. Plan de inspecciones Sondeo de precios. Dirección Nacional de Medicamentos. Defensoría del Consumidor
- TEXAS DEPARTMENT OF STATE HEALTH SERVICES. 2011. La Criptosporidiosis. Texas, USA. <http://www.dshs.texas.gov/idcu/espanol/cryptosporidiosis/pyrs/>
- ULLOA-STANOJLOVI, F. Occurrence of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium sp.* in wastewater samples from São Paulo State, Brazil, and Lima, Perú. *Environ Sci Pollut Res*. Agosto 2016.
- Waterborne, Inc. Environmental and Clinical Parasitology Products. <http://waterborneinc.com/distributor-page/>. Crypt-a-Glo| Giardi-a-Glo
- XIAO, SHUMIN; ZHANG, YAN; ZHAO, XIAOYUN, otros. Presence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recreational lake water in Tianjin, China: a preliminary study. *SCIENTIFIC REPORTS*. Tianjin, China. 8. Febrero 2018. Pág 1-8.