



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE
MÉTODOS DE TINCIÓN TRADICIONALES EN LA DETECCIÓN
DEL PROTOZOARIO ZONÓTICO *Cryptosporidium parvum* EN
MUESTRAS DE AGUA INOCULADAS CON EL AGENTE.

ROBERTO MOLINA OBREGÓN

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

NOTA FINAL:

NOTA FIRMA

PROFESOR GUÍA	: FERNANDO FREDES
PROFESOR CONSEJERO:	RUBÉN MERCADO
PROFESOR CONSEJERO:	GUSTAVO FARIAS

SANTIAGO, CHILE.
2010

ÍNDICE.

I. RESUMEN	4
II. ABSTRACT	5
III. INTRODUCCIÓN	6
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
4.1 Etiología	9
4.1.1 Taxonomía	9
4.1.2 Morfología	11
4.1.3 Ciclo biológico	11
4.1.4 Localización en el hospedador	14
4.2 Patogenia	15
4.3 Signos clínicos	15
4.4 Aspectos epidemiológicos	16
4.4.1 Patógeno re-emergente	16
4.4.2 Distribución geográfica y prevalencia	17
4.4.3 Fuentes de infección y vías de transmisión	18
4.4.4 Brotes de criptosporidiosis a través de fuentes de agua	21
4.4.5 Factores de Riesgo	22
4.5 Control y Profilaxis	23
4.6 Diagnóstico	24
4.6.1 Examen histológico	24
4.6.2 Detección de ooquistes en heces	25
4.6.3 Detección de ooquistes en agua	26

V. OBJETIVO GENERAL	28
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	29
7.1 Agente zoonótico en estudio	29
7.2 Contaminación o inoculación artificial de muestras de agua	29
7.3 Recuperación de los ooquistes inoculados en las muestras de agua	31
7.4 Técnicas microscópicas tradicionales de tinción en estudio	32
7.4.1 Ziehl-Neelsen modificada	32
7.4.2 Aureamina	32
7.5 Determinación comparativa de la sensibilidad analítica o del límite de detección de la técnicas microscópicas en estudio	33
7.6 Bioseguridad	33
VIII. RESULTADOS	34
IX. DISCUSIÓN	37
X. CONCLUSIONES	41
XI. BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS	49
Anexo I	49
Anexo II	50
Anexo III	51
Anexo IV	52

I. RESUMEN.

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria del tracto digestivo producida por protozoos del género *Cryptosporidium*. Aunque las especies de este agente se describieron desde comienzos del siglo veinte, solo a fines de éste, se ha reconocido como un patógeno ampliamente distribuido en diferentes animales y como una amenaza para la salud pública. Infecciones por este protozoario se encuentran descritas en todos los continentes, incluida la Antártica. En los humanos y otras especies, es considerada una zoonosis re-emergente. El primer brote de criptosporidiosis transmitido a través del agua, fue descrito en 1984, desde ese año numerosos autores han evidenciado la presencia de este endoparásito en aguas de superficie y residuales no tratadas, sugiriendo su rol como agente etiológico de diarrea. La persistencia y diseminación de éste protozoo en el ambiente, se sustenta en tres hechos biológicos: (1) Sus ooquistes son inmediatamente infectantes; (2) resiste condiciones medio ambientales y (3) al medir 4,5-5,4 µm, resistir a la acción de desinfectantes convencionales y al no ser es afectado por los procesos físicos de tratamientos de aguas, puede sobrevivir en ella por varios meses. A pesar de que existen diversas metodologías descritas en el mundo, para detectar este parásito en muestras de este tipo, el presente estudio sería el primer intento de desarrollar un protocolo estandarizado, hasta la fecha en Chile. Por lo anterior, el principal objetivo de este estudio estuvo dirigido a estandarizar en Chile un protocolo que permita la recuperación, concentración y detección de ooquistes de *Cryptosporidium* de origen animal y humano en muestras de aguas, usando las tinciones de Ziehl-Neelsen y Aureamina. Para esto, ooquistes de *C. parvum* aislados de heces de terneros y humanos diarreicos, previamente estudiados mediante Crypto-Strip® (inmunocromatografía) y PCR especie-específica, fueron artificialmente inoculados en muestras de aguas en concentraciones decrecientes. Se comparó la sensibilidad analítica de ambas tinciones, obteniéndose la mínima concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* que son requeridos para dar una muestra como positiva. Los resultados, expresados en ooquistes/mL, muestran que ambas tinciones tienen una sensibilidad analítica similar, ya que son capaces de detectar hasta la concentración de 1.953 ooquistes en 250 mL, es decir, 7,8 ooquistes /mL. A partir de esto, se puede concluir que el uso de una u otra tinción en la pesquisa de este parásito en muestras de aguas, no se debe basar en la sensibilidad de las mismas, sino en ventajas y desventajas metodológicas para su implementación.

II. A B S T R A C T.

Cryptosporidiosis is a parasitic disease of the digestive tract caused by protozoa *Cryptosporidium* spp. Although the species of this agent have been reported since the beginning of the twentieth century, at the end of it has been recognized as a pathogen widely distributed in different animals and a threat to public health. This protozoan has been described in all continents, including Antarctica. The infection in humans and some animals is considered a re-emerging zoonosis. The first outbreak of cryptosporidiosis transmitted through the water was described in 1984, since then many authors have shown the presence of this endoparasite in surface and untreated waste water and its role as the etiologic agent of diarrhea. The persistence and spread of *Cryptosporidium* in the environment it is based on three biological events: (1) Its oocysts are immediately infectious, (2) resist environmental conditions and (3) resist conventional disinfectants and was not affected by the physical processes of water treatment, it can survive for several months. Although there are various methodologies described in the world, to detect the parasite in samples of this type, this study would be the first attempt to develop a standardized protocol, so far in Chile. Therefore, the main objective of this study was to compare the sensitivity of the Ziehl-Neelsen and Aureamina staining methods for the recovery, concentration and detection of human and bovine *Cryptosporidium* oocysts of in water samples in Chile. For this purpose, oocysts of *C. parvum* isolated from feces of diarrheic calves and humans, previously studied by Crypto-Strip® (immunochromatography) and species-specific PCR, were artificially inoculated in water samples in decreasing concentrations. The lowest number of *Cryptosporidium* oocysts that are required to give a positive water sample was used for analytical sensitivity comparison of both staining methods. The results, expressed as (oocysts/mL), showed that both staining methods have similar analytical sensitivity, as they are able to detect 1,953 *Cryptosporidium* oocysts in 250 mL of water, ie, 7,8 oocysts/mL. Concluding, the selection of either modified Ziehl-Neelsen or Aureamina staining methods to detect this parasite in water samples, should not be based in the sensitivity of the procedures, but in the methodological advantages and disadvantages for its implementation.

III. INTRODUCCIÓN.

Cryptosporidium fue descrito por primera vez por Tyzzer en 1910, en el intestino de un ratón y permaneció como una curiosidad biológica hasta los años '70. El primer caso de criptosporidiosis clínica conocido afectó a un ternero y fue publicado en 1971, en tanto que la criptosporidiosis humana fue informada por primera vez en 1976, cuando se encontró el parásito en la biopsia rectal de una niña (Nime *et al.*, 1976; Barriga, 1983; Botero y Restrepo, 2003)

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria del tubo digestivo, producida por protozoos del género *Cryptosporidium* spp. Aunque las especies de *Cryptosporidium* se han descrito desde comienzos del siglo veinte, a fines de éste se ha reconocido como un agente patógeno ampliamente distribuido en diferentes especies animales, como en la ganadería, aves de corral, animales de compañía y de vida silvestre, así como una amenaza para la salud pública (Fayer, 2004; Gómez-Couso *et al.*, 2005). Este protozoario se encuentra descrito en todos los continentes (Neira, 2005; Fayer y Xiao, 2007), incluida la Antártica recientemente (Fredes *et al.*, 2007). En los humanos y algunos animales, es considerada una zoonosis re-emergente (Almeida *et al.*, 2006; Sunnotel *et al.*, 2006).

El género *Cryptosporidium* comprende protozoos que se desarrollan y multiplican en las células epiteliales del digestivo y ocasionalmente, puede infectar otros epitelios como el respiratorio y renal, especialmente en individuos inmunocomprometidos (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Mercado *et al.*, 2007). Tiene una ubicación particular dentro de la célula ya que se sitúa en el borde luminal de los enterocitos, localización que se ha definido como intracelular, pero extracitoplasmática (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004).

Su ciclo biológico se desarrolla en dos fases reproductivas: asexual (esquizogonia) y sexual (gametogonia), las cuales se desarrollan, ambas, dentro del mismo hospedador y en el interior de los enterocitos, donde se producen ooquistes inmediatamente infectantes (esporulación), que son expulsados por las heces contaminando el medio ambiente (Acha y Szyfres, 2003).

La transmisión es horizontal y la infección ocurre con la ingestión de ooquistes. En terneros, la transmisión del parásito sería principalmente directa, vía oral-fecal, y la principal fuente de infección serían las heces excretadas por los animales neonatos con diarrea, aunque

también, hay que considerar la eliminación de ooquistes por parte de los animales adultos, que actúan como portadores asintomáticos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Así también es de gran importancia, desde el punto de vista de salud pública, la transmisión indirecta a través de los alimentos y el agua, contaminados con ooquistes, debido a que es frecuente encontrar ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas para consumo humano (Kirby *et al.*, 2003; Fayer, 2004; Krewski *et al.*, 2004).

El número de comunicaciones de brotes de criptosporidiosis en países desarrollados, por consumo de aguas contaminadas con este agente, se ha incrementado en los últimos años, ya sea por aguas de piscina, aguas de ríos e incluso redes de agua potable (Atías, 1998; García, 2001; Fayer, 2004; Fayer y Xiao, 2007).

Su hallazgo frecuente en el agua, evidencia que los métodos de tratamientos de purificación de éstas, no son completamente eficientes en la separación o inactivación de los ooquistes (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004). Debido a esto, es frecuente encontrar *Cryptosporidium* spp. en aguas superficiales, subterráneas, estuarios de mar y potable, por lo que su hallazgo podría ser utilizado como un indicador de calidad e inocuidad de agua (Abramovich *et al.*, 2000).

Por lo anterior, la principal fuente de infección es el agua o los alimentos regados con ésta, al estar contaminadas con heces de origen animal o humano, que contengan ooquistes de este protozoo.

En medicina veterinaria el método diagnóstico de rutina, es el de detección de ooquistes en extendidos de heces, previamente concentradas, mediante la tinción de Zielh-Neelsen modificada (ZN). Otra técnica de tinción para el diagnóstico de este protozoo es la de Aureamina (AU), utilizada principalmente en medicina humana. Éste método, consiste en la observación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en extendidos de heces, previamente concentradas, pero a través de microscopía de fluorescencia. Además, posee ventajas frente al método de tinción de ZN, en cuanto a la rapidez en su realización y lectura (De Quadros *et al.*, 2006).

El diagnóstico de los ooquistes de *Cryptosporidium*, especialmente en muestras del medio ambiente (lodos, suelo y agua), incluyen el examen microscópico de estas muestras, procesadas con métodos de tinción, técnicas inmunodiagnósticas y recientemente, a nivel

mundial, protocolos moleculares usando la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR), aduciendo su mayor sensibilidad y especificidad (Fayer, 2004; Del Coco *et al.*, 2009).

En Chile, no existen antecedentes de laboratorios que realicen protocolos de detección microscópica en esta matriz, como son las muestras de agua y a nivel internacional, es escasa la información acerca del uso de estas técnicas, para la detección del parásito en muestras ambientales, a pesar que existen antecedentes de la transmisión de este agente zoonótico por el agua. Es por esta razón, que en la presente memoria se pretende evaluar la sensibilidad diagnóstica comparativa de dos técnicas microscópicas utilizadas para la detección de este agente: la tinción de Ziehl-Neelsen y la de Aureamina. Ambas, realizadas en extendidos de muestras de agua procesadas y que previamente fueron contaminadas o inoculadas, con ooquistes de *Cryptosporidium parvum*.

IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

4.1 Etiología:

4.1.1 Taxonomía:

El género *Cryptosporidium*, que se encuentra en constante revisión taxonómica, está incluido en el phylum Apicomplexa, clase Sporozoa, subclase Coccidia, orden Eucoccidiida, suborden Eimeriina, familia Cryptosporidiidae (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Desde que fue descrito por Tyzzer (1910), se han definido una gran variedad de especies del género, siendo actualmente reconocidas solo veinte de ellas como válidas (Cuadro 1). *Cryptosporidium parvum* es la especie que más afecta a los animales, incluido el hombre, reportándose en más de 150 mamíferos distintos, lo que se traduce en que este parásito no es hospedero específico. Se describe por ejemplo, que *C. parvum* ha sido identificado en ratones, bovinos, humanos, equinos y muchos otros mamíferos. *C. baileyi*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* y *C. muris*, se describen que son hospederos específicos para gallinas, perros, gatos, pavos y ratones respectivamente; sin embargo, éstos pueden afectar a los humanos, por lo tanto deberían también considerarse zoonóticos (Tyzzer, 1910; Fayer, 2004).

Cuadro 1. Descripción de las 20 especies válidas de *Cryptosporidium* con sus distintos tipos de hospederos (Fayer, 2009; Smith y Nichols, 2010).

Especie	Hospedero principal	Hospedero secundario	Sitio de infección
<i>C. hominis</i>	Humanos	Dugongo, ovinos	Intestino Delgado
<i>C. parvum</i>	Bovinos, ganado, humanos	Ciervos, ratones, cerdos	Intestino Delgado
<i>C. meleagridis</i>	Pavos, humanos	Loros	Intestino Delgado
<i>C. canis</i>	Perros	Humanos	Intestino Delgado
<i>C. felis</i>	Gatos	Humanos, bovinos	Intestino Delgado
<i>C. suis</i>	Cerdos	Humanos	Intestino delgado y grueso
<i>C. wrairi</i>	Cobayos	Desconocido	Intestino Delgado
<i>C. muris</i>	Roedores	Humanos, caprinos	Estómago
<i>C. andersoni</i>	Bovinos, camellos	Ovinos	Abomaso
<i>C. bovis</i>	Bovinos	Ovinos	Intestino Delgado

<i>C. ryanae</i>	Bovinos	Desconocido	Desconocido
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos	Yak, carpinos	Desconocido
<i>C. fayeri</i>	Canguros	Desconocido	Intestino delgado
<i>C. macropodum</i>	Canguros	Desconocido	Desconocido
<i>C. baileyi</i>	Aves de corral	Codornices, avestruces, patos	Bursa
<i>C. galli</i>	Pinzones, pollos	Desconocido	Proventrículo
<i>C. serpentis</i>	Lagartos, serpientes	Desconocido	Estómago
<i>C. varanii</i>	Lagartos	Serpientes	Estómago e intestino delgado
<i>C. molnari</i>	Peces	Desconocido	Estómago (intestino)
<i>C. scophthalmi</i>	Peces	Desconocido	Intestino (estómago)

En bovinos, son al menos cuatro las especies descritas de *Cryptosporidium* que producen infección, *C. parvum*, de mayor prevalencia en terneros neonatos; y *C. andersoni*, *C. bovis* y *C. ryanae* (Santín *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2007; Fayer, 2009). En el hombre en tanto, se han descrito al menos ocho especies que causan infección, *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. suis* y el *Cryptosporidium* genotipo cervine (Cama *et al.*, 2008). Siendo los más frecuentes de detectar *C. hominis* y *C. parvum* (Xiao y Ryan, 2004; Sunnotel *et al.*, 2006; Mercado *et al.*, 2007; Cama *et al.*, 2008).

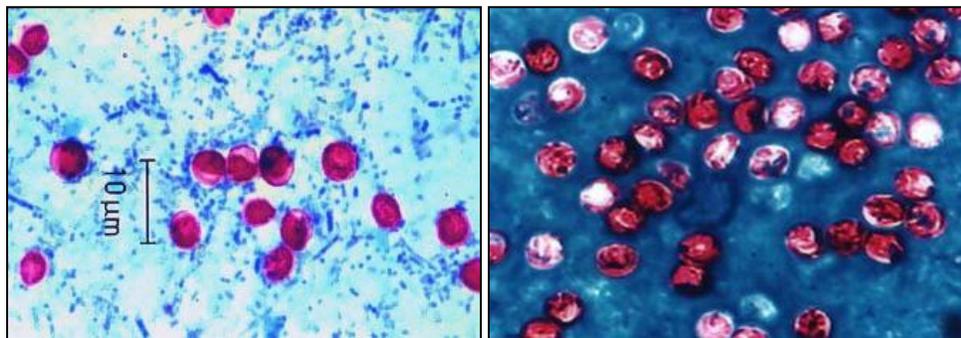
En humanos y en otros mamíferos, *C. parvum* es reconocido como un patógeno que genera graves problemas de diarrea (Barriga, 2002). Estudios moleculares en ooquistes de *Cryptosporidium*, han demostrado la presencia de más de un genotipo de *C. parvum*: genotipo bovino, genotipo II y genotipo B, ya que el llamado *C. parvum* genotipo I, en la actualidad se denomina *C. hominis*, el que sólo afecta al hombre (Hashim *et al.*, 2004; Fayer, 2009). El genotipo II se describe como el *C. parvum*, responsable de la infección y zoonosis entre animales y seres humanos (Neira, 2005).

Estas dos especies de *Cryptosporidium*, *C. parvum* y *C. hominis*, se consideran agentes importantes en la presentación de la enfermedad, tanto en individuos inmunocompetentes, como en individuos inmunocomprometidos (Almeida *et al.*, 2006), aunque *C. hominis*, es el que predomina por sobre *C. parvum*, en casos de brotes de cryptosporidiosis humana (Hashim *et al.*, 2004).

4.1.2 Morfología:

En relación a la morfología de los ooquistes, se describe que éstos tienen forma sub-esférica, con un tamaño aproximado según la especie de 3,5 a 8 μm de diámetro, son esporulados al ser excretados y poseen cuatro esporozoitos en su interior (Figura 1) (Current, 1985; Soulsby, 1987; Georgi y Georgi, 1990; Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer y Xiao, 2007). En el caso particular de *C. parvum*, éste presenta ooquistes casi esféricos de 4 a 6 μm (5,4 x 4,5 μm) y es la principal especie involucrada en los cuadros de enteritis aguda y diarrea, en mamíferos (García y Bruckner, 1988; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; García, 2001, Castro-Hermida *et al.*, 2002a; Castro-Hermida *et al.*, 2002b; Fayer, 2004; Santín *et al.*, 2004).

Figura 1. Morfología de los ooquistes de *Cryptosporidium*, sub-esféricos de un tamaño aproximado de 4 a 6 μm de diámetro (Tinción de Ziehl-Neelsen). Obtenido de: www.gefor.4t.com



4.1.3 Ciclo biológico:

Cryptosporidium spp. es un parásito monógeno y heterogénico, lo primero debido a que todos los estadios de desarrollo, ocurren en un mismo hospedador y lo segundo, ya que el parásito tiene fases de reproducción asexual y sexual (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

El ciclo comienza con la ingestión de ooquistes esporulados (eliminados por las heces de un individuo infectado), seguida por el desenquistamiento en el tracto gastrointestinal del hospedador, liberándose los cuatro esporozoitos (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999). En esta fase influyen factores tales como: la temperatura corporal, ácido clorhídrico, sales biliares y enzimas digestivas (Del Coco *et al.*, 2009). Los esporozoitos liberados, son móviles e invaden

activamente la célula hospedadora, mediante movimientos de deslizamiento y flexión, penetrando la zona apical de las microvellosidades (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Thompson *et al.*, 2005). El extremo anterior de cada esporozoito, se adhiere a través del antígeno tipo circumsporozoito (CSL) a un receptor presente en las microvellosidades intestinales (Fayer, 2004; Del Coco *et al.*, 2009). Del extremo anterior del parásito, surge una vacuola que se fusiona con la membrana de la célula, para formar una interfase hospedador-parásito. El parásito queda contenido en una vacuola denominada parasitófora, de ubicación intracelular, pero extracitoplasmáticamente (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Del Coco *et al.*, 2009) (Figuras 2 y 3).

Figura 2. Ciclo biológico del protozoo *Cryptosporidium* spp.
 Obtenido de: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cryptosporidiosis.htm>

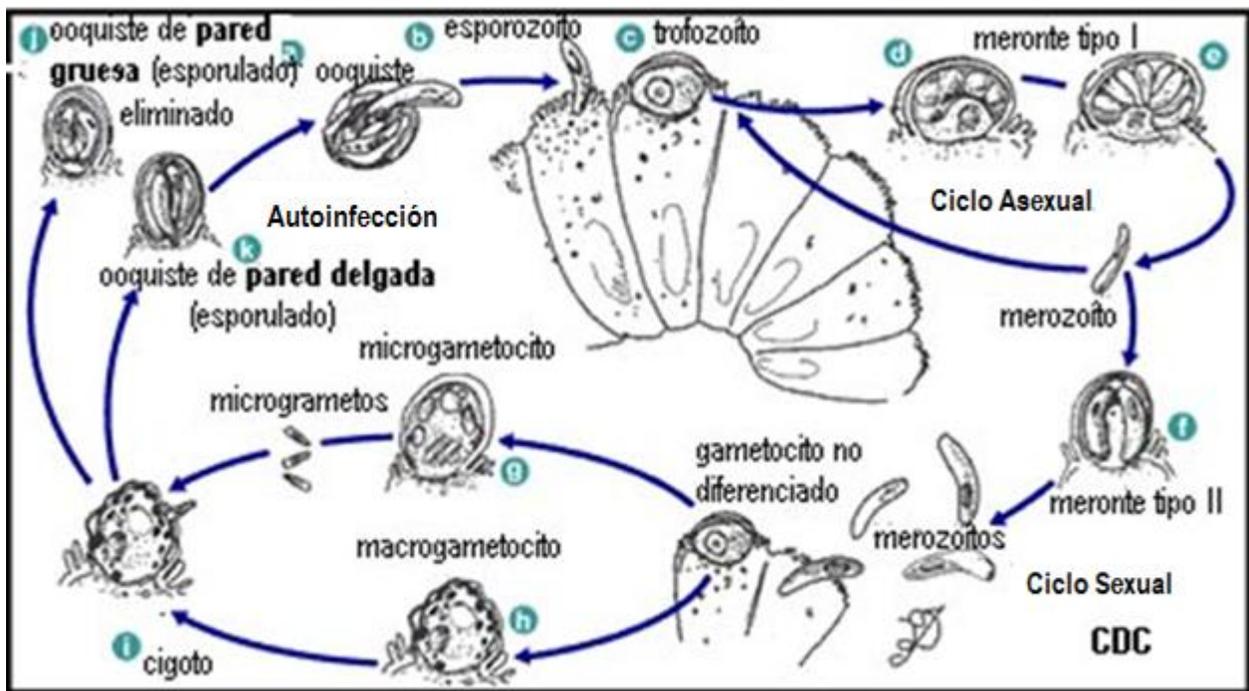
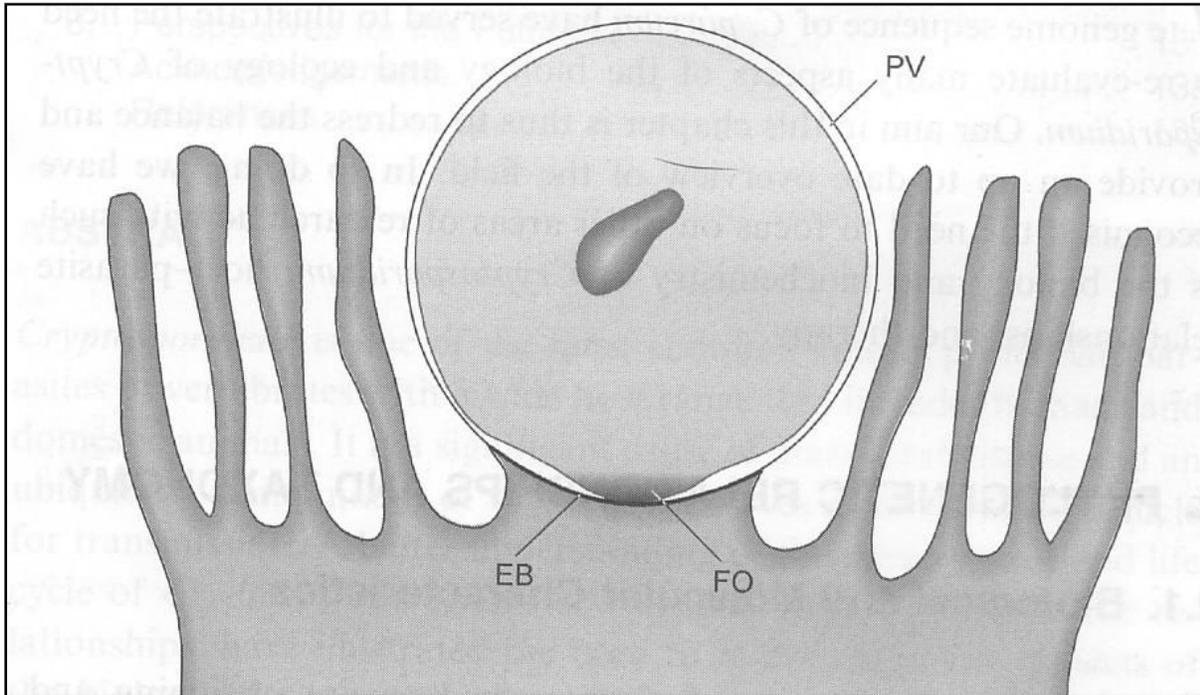


Figura 3. (PV: vacuola parasitófora, EB: banda electrodensa, FO: organelo alimentador).
Obtenido de: Thompson *et al.*, 2005.



Las etapas de reproducción incluyen dos fases de esquizogonia (multiplicación asexual), la de gametogonia (multiplicación sexual), así como la fase de esporogonia (esporulación), la cual tiene lugar dentro del hospedador (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Un organelo único, denominado organelo de alimentación o fijación, se desarrolla entre el parásito y el citoplasma de la célula. Allí el parásito crece y sufre una reproducción asexual (merogonia) y origina el meronte tipo 1, con ocho merozoitos en su interior. El estado de merozoito es estructuralmente similar al del esporozoito. Luego de la ruptura del meronte, los merozoitos liberados ingresan en una nueva célula epitelial y desarrollan en su interior un meronte tipo 1 (con ocho merozoitos) o tipo 2 (con cuatro merozoitos). Esto se debe a que algunos merozoitos tipo 1, son capaces de reciclarse indefinidamente con la producción continua de merontes tipo 1. Los merozoitos liberados por el meronte tipo 2 parasitan nuevas células, iniciando la fase sexuada del ciclo, en la cual se diferencian en macrogamonte (femenino) y microgamonte (masculino). El macrogamonte evoluciona a macrogameto inmóvil, femenino uninucleado y permanece en el interior del enterocito. El microgamonte se multiplica por fisión múltiple y origina 16 microgametos móviles, que abandonan la célula parasitada en busca de los

macrogametos. Luego de la fecundación del macrogameto, se origina el huevo o cigoto, único estado diploide del ciclo, que resultará en el ooquiste al adquirir la pared quística. Se produce la esporogonia, en la cual el núcleo diploide sufre una meiosis reduccional y se forman cuatro células haploides, los esporozoitos, que quedan contenidos dentro del ooquiste. Este se libera finalmente del enterocito y es eliminado al medio ambiente (García y Bruckner, 1988; Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2005; Del Coco *et al.*, 2009).

La formación de la pared del ooquiste acontece antes que la esporulación, que tiene como consecuencia la formación de cuatro esporozoitos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). El 80% de los ooquistes, presentan doble pared y constituyen las formas de resistencia, encargadas de la transmisión entre hospedadores. El resto de los ooquistes son de pared delgada (20%) y los responsables de la autoinfección (García y Bruckner, 1988; Georgi y Georgi, 1990; Barriga, 2002; Del Coco *et al.*, 2009). El periodo de prepatencia, tiene una duración de 2 a 7 días en terneros, mientras que en humanos es de 4 a 22 días, según se trate de individuos inmunocompetentes o inmunosuprimidos. En cuanto al periodo de patencia, éste tiene una duración de 1 a 12 días en terneros y de 1 a 20 días en humanos (Fayer, 2004; Del Coco *et al.*, 2009).

4.1.4 Localización en el hospedero:

Cryptosporidium se localiza en el intestino delgado, principalmente en las partes finales del yeyuno e íleon, aunque también puede afectar el intestino grueso, principalmente ciego y colon, y otros órganos extra intestinales (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Este parásito se sitúa en el borde luminal de los enterocitos, localizándose en el intracelular, pero extracitoplasmáticamente (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Del Coco *et al.*, 2009), causando diarrea autolimitada en hospederos inmunocompetentes y diarrea crónica en individuos inmunocomprometidos, como es el caso de pacientes humanos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Del Coco *et al.*, 2009). En el caso específico de *C. parvum*, este afecta la parte distal del intestino delgado, de terneros jóvenes, humanos y otros animales, y ocasionalmente, puede afectar el aparato respiratorio, renal y vesícula biliar, sobre todo en individuos inmunodeficientes (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Mercado, 2007).

4.2 Patogenia:

La invasión que provoca este protozoo en los enterocitos, produce una alteración de las células digestivas, reduciendo el borde de las microvellosidades, lo que se traduce en una atrofia parcial de las vellosidades intestinales y la fusión de éstas, quedando la superficie de absorción disminuida (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Del Coco *et al.*, 2009). El organismo intenta reemplazar las células dañadas mediante hiperplasia de las criptas, intercambiando las células maduras dañadas por otras nuevas, cuya capacidad enzimática y de absorción es menor, lo que se traduce en un paso de fluidos desde la vellosidad a la luz intestinal, debido al aumento de la presión osmótica, por el acúmulo de nutrientes en el lumen (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Del Coco *et al.*, 2009). La combinación de la pérdida del tamaño de las vellosidades y del borde microvellositario, disminuye la absorción de fluidos, electrolitos y nutrientes, lo cual conduce a la pérdida de enzimas digestivas de membrana, que contribuye a la malabsorción y la desnutrición. La malabsorción y la alteración de la digestión, producen un sobre-crecimiento de la microflora intestinal, cambios en la presión osmótica e influjo de líquido hacia la luz intestinal (Del Coco *et al.*, 2009). Paralelamente, puede existir una alteración en la permeabilidad del epitelio intestinal, por la modificación de las uniones celulares (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

4.3 Signos clínicos:

No existen signos patognomónicos que diferencien a la criptosporidiosis, de procesos causados por otros enteropatógenos. El principal signo clínico es la diarrea, de consistencia variable, entre heces aparentemente formadas y acuosas, color amarillento, sin sangre, asociada a la excreción de un gran número de ooquistes, que puede ir acompañada de anorexia, dolor abdominal, pérdida de peso, postración y fiebre. Su duración es variable, oscilando entre 3-5 días en los casos leves y 1-2 semanas en los más graves (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). El síndrome de mala absorción además, lleva a un sobrecrecimiento bacteriano que agrava aún más el cuadro (Atías, 1998).

En infecciones naturales, la aparición de los síntomas y la eliminación de ooquistes, comienzan en la primera o segunda semana de vida (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Las alteraciones observadas a la necropsia de un rumiante neonato, son la caquexia y la deshidratación. En la cavidad abdominal, puede existir atrofia de la grasa mesentérica e infarto en

los linfonódulos regionales. El intestino delgado podría presentar una enteritis congestiva, con la mucosa hiperémica, pero no hemorrágica y al observar las vellosidades, éstas se pueden presentar atrofiadas y con el epitelio columnar sustituido por células inmaduras (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

4.4 Aspectos epidemiológicos:

4.4.1 Patógeno re-emergente:

Cryptosporidium es un patógeno entérico que provoca una enfermedad diarreica, cuya morbilidad y mortalidad son significativas tanto para los seres humanos como para los animales. El desarrollo de nuevas técnicas para el diagnóstico molecular ha permitido identificar a *C. hominis* y *C. parvum*, como aquellos que con mayor prevalencia infectan al hombre (Xiao y Ryan, 2004; Sunnotel *et al.*, 2006; Mercado *et al.*, 2007; Cama *et al.*, 2008; Pintar *et al.*, 2010). Las vías de transmisión son múltiples (persona a persona, animales a personas, agua y alimentos) y la enfermedad, puede afectar a individuos inmunocomprometidos o no (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Luna *et al.*, 2002; Fayer, 2004; Yoder y Beach, 2010).

Este microorganismo es ubicuo, ya que su aparición no está limitada a ninguna región geográfica o al grado de desarrollo tecnológico de la misma. Es así como los procesos de urbanización acelerados, la expansión de la pobreza, las migraciones no controladas de personas, la facilidad y rapidez en los desplazamientos, el movimiento creciente de animales y de productos de origen animal, la falta de saneamiento ambiental, son algunos de los factores que, sumados a la escasez de normas legales regulatorias, han posibilitado la dispersión del agente y de la enfermedad. Esto junto a la resistencia a los antibióticos, incrementan las tasas de morbilidad y mortalidad así como los gastos de atención médica asociados con el control de brotes epidémicos, por lo que la criptosporidiosis representa una amenaza de alcance mundial, que exige una respuesta coordinada de los servicios de salud pública de todos los países (Fayer, 2004; Zanaro y Garbossa, 2008; Yoder y Beach, 2010).

4.4.2 Distribución geográfica y prevalencia:

Este protozooario es de distribución cosmopolita y ha sido descrito en todos los continentes, incluido el Antártico (Fredes *et al.*, 2007). Se considera entre las principales causas

de diarrea por parásitos eucarióticos, en humanos, vacunos y otros animales (Del Coco *et al.*, 2009). En ganado bovino, afecta tanto a razas de carne como de leche y es más prevalente en animales jóvenes principalmente lactantes, menores de un mes de edad (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Barriga, 2002) y se considera un agente re-emergente (Fayer, 2004).

La prevalencia de la enfermedad en países industrializados oscila entre 0,1 y 27,1%, con una media de 4,9%, mientras que en países en desarrollo los resultados varían entre 0,1 a 31,5%, con una media de 7,9%, excluyendo los brotes epidémicos específicos y a los sujetos con SIDA. Aún cuando los estudios epidemiológicos han demostrado que, la parasitosis está más difundida de lo que anteriormente se pensaba, es difícil determinar la extensión del problema, tanto a nivel médico veterinario como humano (Uribarren, 2010).

La prevalencia de esta enfermedad varía considerablemente con la edad de los animales. Así por ejemplo, en un estudio realizado en terneros diarreicos menores de 30 días de edad, la menor prevalencia de infección, se obtuvo en los animales que se encontraban en los extremos de este rango etario, es decir entre los menores de 7 días y los mayores de 22 días; mientras tanto, que la mayor prevalencia, se observó en terneros de rangos intermedios al mes de edad, es decir de 8 a 14 y de 15 a 21 días (De la Fuente *et al.*, 1999). Otros trabajos han reportado que la prevalencia de cryptosporidiosis bovina está subestimada, debido al bajo número de muestras tomadas durante los distintos periodos de estudio. Lo anterior se basa en un trabajo que demuestra una mayor prevalencia de infección 93%, cuando el análisis de muestras de heces de terneros se realiza durante el periodo de pre-destete y se hace dos veces por semana durante un mes. En tanto que la prevalencia es menor a un 30%, cuando se examina una o dos muestras por ternero durante el primer mes de vida (Castro-Hermida *et al.*, 2002a).

En la especie humana, la prevalencia de la criptosporidiosis es mayor en áreas menos desarrolladas, como África con una prevalencia de 2,6 - 21,3%, Asia 1,3 - 13,1%, América del Sur y centro América, con porcentajes entre el 3,2 - 31,5%, a diferencia de Europa y América del Norte con valores de 0,1 - 14,1% y 0,3 - 4,3% respectivamente, con especial repercusión en la población infantil y en pacientes inmunocomprometidos (Ungar, 1990; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004). La criptosporidiosis es considerada la quinta causa de diarrea en niños

inmunocompetentes y la prevalencia en la población infantil varía de 2 a 30 %, según los países y las condiciones higiénicas de las poblaciones estudiadas (Botero y Restrepo, 2003).

En nuestro país, es un agente endémico que está descrito en una serie de animales domésticos y también, en los seres humanos (Atías, 1998; Alcaíno y Gorman, 1999). En la Región de Valparaíso y en el resto del país, los estudios de esta coccidiosis se iniciaron en humanos y animales, hacia fines de la década 80`, detectándose su presencia en 8 de las 13 regiones, de acuerdo a la división político-administrativa de ese periodo. El análisis epidemiológico realizado en 1992, reportó en las diferentes regiones del país, una prevalencia que fluctuó entre 3,2 y 19,3%, de esta zoonosis, en humanos sintomáticos o asintomáticos. Los estudios revelaron una distribución no homogénea, siendo mayor en la zona norte del país, probablemente por las condiciones climáticas más extremas (Mercado, 1992; Neira, 2005).

La relación epidemiológica más importante, se ha encontrado en portadores de VIH y en pacientes con SIDA. En ambos casos, el parásito se comporta como un agente invasor oportunista. Se cree que en países desarrollados, los pacientes VIH positivo son portadores del parásito entre el 10 y 15 % y en países en vías de desarrollo entre el 30 y 50 % (Botero y Restrepo, 2003). Se calcula que en el año 2000, el número de personas infectadas con VIH en el mundo fue de 38 millones, esta cifra alarmante, que aumenta permanentemente, hace necesario que se establezcan medidas de control para los agentes oportunistas, como *Cryptosporidium*, a través de la disminución de la contaminación fecal y la mejora del saneamiento ambiental (Botero y Restrepo, 2003).

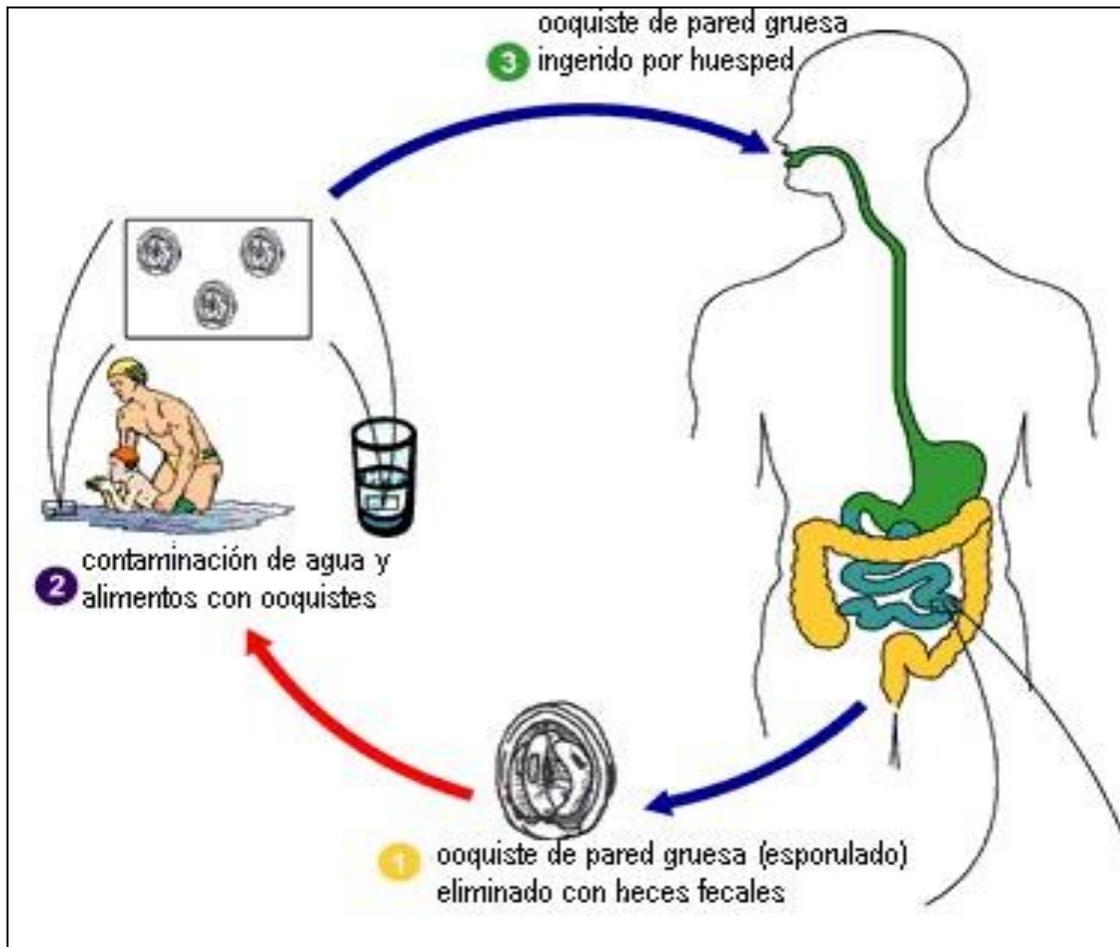
Un estudio reciente realizado en el Laboratorio de Parasitología de FAVET, Universidad de Chile, en terneros diarreicos, de predios lecheros de la Región Metropolitana, ha encontrado altos niveles de infección, de un 57% (datos sin publicar), esto sugiere que, al menos en los predios analizados de esta región del país y en esta especie animal, estamos frente a una infección altamente prevalente y re-emergente. Esto se sustenta, en el hecho que la prevalencia descrita para este parasitismo, en terneros diarreicos de lechería y en esta región, según estudios anteriores, fue de un 23,2% (Gorman *et al.*, 1989). Lo que al comparar ambos estudios, implica una prevalencia predial de más del doble, utilizando técnicas de diagnóstico similar, para la misma especie animal y aproximadamente el mismo grupo etario.

4.4.3 Fuentes de infección y vías de transmisión:

La transmisión de este parásito es directa, vía fecal-oral, siendo la principal fuente de infección en rumiantes domésticos, las heces excretadas por terneros neonatos diarreicos infectados con el agente, aunque también se debe considerar la eliminación de ooquistes por los animales adultos, que actúan como portadores asintomáticos. En los animales neonatos infectados, se describe que durante el periodo de máxima eliminación, pueden excretar entre 10^6 - 10^7 ooquistes por gramo de heces (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

También se ha descrito la transmisión indirecta de esta parasitosis, ya sea a través de los alimentos o por ingesta de aguas contaminadas, con este agente protozoario (Figura 4) (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Siendo esta vía indirecta, la más significativa desde el punto de vista epidemiológico, en cuanto a su diseminación dada las características del parásito, ya que, posee ooquistes de pequeño tamaño, una gruesa pared quística, resistencia al tratamiento con cloro y ácidos, viabilidad prolongada de hasta varios meses en el ambiente, excreción de estadios inmediatamente infectivos, baja dosis infectante para infectar otros organismos y considerable potencial zoonótico (García, 1999; Zanaro y Garbossa, 2008; Yoder y Beach, 2010). La contaminación de aguas de consumo con material fecal de ganado bovino o humano, se ha asociado con brotes de diarrea causada por este parásito. Esto debe ser considerado desde el punto de vista de la salud pública, ya que los métodos usuales de tratamiento de aguas potables (filtración, floculación, sedimentación y desinfección), no son completamente eficaces en la remoción o inactivación de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Luna *et al.*, 2002; Kirby *et al.*, 2003; Fayer, 2004; Krewski *et al.*, 2004).

Figura 4. Ciclo biológico del protozoo *Cryptosporidium* spp.
Obtenido de: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cryptosporidiosis.htm>



Se ha descrito la importancia en la transmisión de la criptosporidiosis, de las fuentes de agua recreacionales, como piscinas públicas, estuarios y agua de mar. En el caso de piscinas públicas, la combinación de contaminación fecal frecuente, la resistencia de los ooquistes a la acción del cloro, la baja dosis infectante necesaria y la alta densidad de personas en estas, la transforma en una importante fuente de transmisión. En el caso de estuarios y aguas de mar, se describe la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en mariscos, debido a que estos filtran pequeñas partículas provenientes del agua para su alimentación. Mediante el uso de pruebas moleculares los ooquistes que están presentes en mayor cantidad son *C. parvum* y en menor cantidad *C. hominis*, *C. baileyi* y *C. canis*. También se ha descrito la presencia de ooquistes en aquellas zonas en las cuales desembocan los canales o aguas de alcantarillados (Fayer, 2004).

4.4.4 Brotes de criptosporidiosis a través de fuentes de agua:

La criptosporidiosis es una infección entérica animal y humana, de considerable incidencia tanto en países desarrollados como en desarrollo. Si bien los primeros casos fueron notificados en 1976, desde 1984, año en que se reportó el primer brote de criptosporidiosis transmitido a través del agua, en San Antonio, Texas, numerosos autores han descrito la presencia de este parásito en aguas de superficie y en aguas residuales no tratadas, y su rol como agente etiológico de diarrea (Madore *et al.*, 1987; Ungar, 1990; WHO, 2009). La enfermedad adquirió verdadera importancia a partir de 1993, oportunidad en la que se produjo el brote epidémico más importante a nivel mundial, en Milwaukee, EE.UU., que afectó a más de 400.000 personas (Fayer, 2004; WHO, 2009). Desde entonces, los casos de criptosporidiosis han sido informados en más de 40 países, tanto en individuos inmunocompetentes, como en pacientes inmunocomprometidos (Fayer, 2004; Zanaro y Garbossa, 2008). La prevalencia de infecciones humanas es menor en los países industrializados, en los que la población tiene acceso a mejores servicios sanitarios y de agua de bebida, que en los países menos desarrollados. Las estadísticas publicadas abarcan valores desde 0,3 a 4,3% en los países de América del Norte hasta cifras que cubren el rango 3,2 a 31,5% en América Central y del Sur (Fayer, 2004; Zanaro y Garbossa, 2008).

Últimamente, se ha incrementado el número de comunicaciones de brotes de criptosporidiosis, incluso en países industrializados como en Estados Unidos, España, Inglaterra, entre otros, por ingesta de aguas contaminadas con este agente, ya sea por aguas de piscina, aguas de ríos e incluso redes de agua potable (Fayer, 2004; Krewski *et al.*, 2004; Fayer y Xiao, 2007; Pintar *et al.*, 2010; Smith y Nichols, 2010), donde supuestamente las condiciones y manejos sanitarios podrían ser considerados como adecuados. Su hallazgo frecuente en el agua para consumo humano, es importante desde el punto de vista de la salud pública ya que, como fue mencionado, los métodos usuales de tratamiento de aguas potables, no son muy eficaces para eliminar o destruir los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Kirby *et al.*, 2003; Fayer, 2004; Krewski *et al.*, 2004; Pintar *et al.*, 2010). Además, que la resistencia de los ooquistes de este protozooario, le permiten sobrevivir por varios meses en el agua potable (García y Bruckner, 1988; Georgi y Georgi, 1990; Atías, 1998; Cordero del

Campillo *et al.*, 1999; Sturbaum *et al.*, 2001; Fayer, 2004; Krewski *et al.*, 2004; Sunnotel *et al.*, 2006; Pintar *et al.*, 2010).

Se ha determinado que la sola presencia de *Cryptosporidium* en aguas superficiales utilizadas para recreación, tanto como en agua potable, es muy frecuente (98% de las muestras). Además, se ha descrito que su hallazgo tiene una correlación estadísticamente significativa con indicadores bacteriológicos de contaminación ambiental, como son: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, como así también, con la materia orgánica y la turbiedad (Abramovich *et al.*, 2000).

La dosis infecciosa para *C. parvum* es muy baja, trabajos realizados con voluntarios sanos, normo-inmunes y sin evidencia serológica de infecciones previas por este parásito, demostraron que la cantidad mínima necesaria para provocarles una infección era de 30 ooquistes, siendo la dosis media de 132 ooquistes (Dupont *et al.*, 1995; Guerrant, 1997; García, 1999; Fayer *et al.*, 2000). Extrapolaciones realizadas a partir del brote ocurrido en Milwaukee, sugieren que la dosis infectante sería posiblemente aún más baja, de 1 a 10 ooquistes (Okhuysen *et al.*, 1999; Dillingham *et al.*, 2002; Zanaro y Garbossa, 2008).

4.4.5 Factores de riesgo:

Tres hechos biológicos tendrían importancia epidemiológica en contribuir a la persistencia y diseminación de este parásito en el ambiente, especialmente en el agua:

1. Los ooquistes son inmediatamente infectantes al salir con las heces de su hospedero (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

2. Estos ooquistes tienen una elevada resistencia a las condiciones medio ambientales, lo que les permite por ejemplo, permanecer infectivos por 2 a 3 semanas (Castro-Hermida *et al.*, 2006) y sobrevivir en el suelo por más de 50 días, a temperaturas inferiores a los -10°C (Kato *et al.*, 2002).

3. Los ooquistes al ser muy pequeños y resistir la acción de desinfectantes convencionales, como la cloración, pueden pasar a través de los procesos físicos y químicos de tratamientos de aguas y por tanto, sobrevivir en agua potable por varios meses (García y Bruckner, 1988; Georgi y Georgi, 1990; Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Sturbaum *et al.*, 2001; Fayer, 2004; Sunnotel *et al.*, 2006).

Por lo anterior, la principal fuente de infección es el agua o los alimentos regados con estas, al estar contaminadas con heces de origen humano o animal que contengan ooquistes de este protozooario.

4.5 Control y Profilaxis:

La criptosporidiosis se contrae, fundamentalmente, por ingestión de los ooquistes. Por lo tanto, las medidas sanitarias efectivas deben recaer, necesariamente, en la implementación de medidas adecuadas para prevenir la transmisión del parásito (Fayer, 2004; Zanaro y Garbossa, 2008).

La remoción de este microorganismo de las aguas, constituye un desafío permanente para las plantas de tratamiento, aún en países con tecnología avanzada. El proceso de potabilización para lograr agua bebible que cumpla los requisitos exigidos por la legislación vigente, abarca las etapas de coagulación, floculación, decantación, filtración y desinfección. Dado que los ooquistes resisten las condiciones del medio ambiente, que el cloro, a las concentraciones usadas para potabilizar el agua no los destruye y que son infectivos aún en bajas dosis, es obvio que, una vez superadas las barreras de tratamiento del agua, el microorganismo estará en condiciones de infectar un nuevo hospedero (Fayer, 2004; Sunnotel *et al.*, 2006; Zanaro y Garbossa, 2008; Pintar *et al.*, 2010; Yoder y Beach, 2010).

El ozono y la luz ultravioleta, han demostrado ser eficaces en la desinfección de ooquistes en las plantas de tratamiento de agua (Fayer, 2004; Yoder y Beach, 2010). El tratamiento con el uso combinado de distintos químicos, como el cloro y la monoclорamina, así como con el ozono y la monoclорamina, han demostrado mayor eficacia que usándolos por separado (Fayer, 2004).

Las medidas que se toman habitualmente durante el procesamiento de alimentos, para controlar la transmisión de enfermedades infecciosas y zoonosis (bajo pH, congelado, calentamiento a 55 °C por 30 seg o a 70 °C por 5 seg), son útiles para eliminar el parásito (Zanaro y Garbossa, 2008).

Respecto a la ganadería, los controles para reducir el impacto de la transmisión zoonótica y la polución del medio ambiente, deberían incluir la adecuada gestión para la eliminación o disposición de los desechos animales (Zanaro y Garbossa, 2008). El control de esta parasitosis en los bovinos es muy difícil, ya que prevenir la exposición de los terneros a la contaminación es

compleja. Las medidas sanitarias y de higiene, ayudan a prevenir la presentación de la enfermedad, a disminuir su prevalencia en zonas endémicas y/o a atenuar el riesgo zoonótico (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Dentro de las medidas sugeridas en la literatura, podemos mencionar: la destrucción de ooquistes mediante la aplicación de desinfectantes eficaces en las zonas que habitan los animales, la separación de los animales enfermos de los sanos, instalar bebederos y comederos altos, para evitar la contaminación de éstos con las heces, la remoción diaria del material fecal, controlar la entrada de otros animales como posibles portadores (perros, ratas, ratones, entre otros), mantener las maternidades limpias y desinfectadas con ozono o luz ultravioleta, controlar la temperatura y humedad de estos lugares, así como procurar que la ingestión de calostro y leche sea la adecuada (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004).

Por otra parte, para las personas inmunocomprometidas, las mejores medidas de profilaxis suponen adoptar buenas prácticas de higiene, evitar la recreación en piscinas públicas, eludir el consumo de aguas superficiales no potabilizadas y evitar el contacto con animales jóvenes (Fayer, 2004; Zanaro y Garbosa, 2008; Del Coco *et al.*, 2009). En hospitales, laboratorios y centros de atención de la salud debería minimizarse el contacto con fuentes de infección; esto implica el aislamiento de personas infectadas, el manejo cuidadoso de todo material biológico peligroso y la correcta gestión y disposición de residuos biológicos (Zanaro y Garbossa, 2008).

4.6 Diagnóstico:

4.6.1 Examen histológico:

La obtención de biopsias de intestino delgado, permite visualizar al parásito en el borde apical de los enterocitos (García y Bruckner, 1988; Atías, 1998). Este método no es usado en el diagnóstico *in vivo*, debido a su carácter invasivo, a su escasa sensibilidad y elevado costo. Existen diversas técnicas de tinción histológica que podrían ser usadas, entre las que se encuentran hematoxilina-eosina y azul de toluidina (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

4.6.2 Detección de ooquistes en heces:

Las distintas técnicas de tinción se realizan sobre extendidos de heces, algunos con el material previamente concentrado, con el propósito de aumentar la sensibilidad (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Los protocolos de laboratorio de rutina para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., tanto en heces como en muestras de medio ambiente (ej. agua), incluyen el examen microscópico de estos extendidos, previa concentración de la muestra, los que son teñidos ya sea con Giemsa, Heine o Ziehl Neelsen (ZN) (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004). Dentro de estas, la técnica más difundida para la detección de ooquistes en heces, es la de ZN modificada ya que se basa en la propiedad de ácido-resistencia del parásito, cuando es sometido a estos procedimientos de coloración (Georgi y Georgi, 1990; Atías, 1998; Barriga, 2002).

Otra técnica de tinción ácido-resistente para el diagnóstico de este protozoo es la de Aureamina (AU), utilizada principalmente en medicina humana. Ésta al igual que la tinción de ZN, consiste en la visualización de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., en extendidos de heces previamente concentradas y teñidas con Aureamina O, pero a través de microscopía de epifluorescencia la que permite ver a los estadios parasitarios fluorescentes (Atías, 1998; Fayer, 2004).

Entre las técnicas inmunodiagnósticas se encuentran la aglutinación en látex, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando anticuerpos poli o monoclonales y ELISA de inmunocaptura de los antígenos en las heces y el diagnóstico Inmunocromatográfico (CryptoStrip®) (García y Bruckner, 1988; Leng *et al.*, 1996; Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Coris, 2001; García, 2001; Botero y Restrepo, 2003; Del Coco *et al.*, 2009). Estas técnicas se han aplicado con el propósito de mejorar la calidad de diagnóstico (Atías, 1998). De los métodos señalados, la inmunofluorescencia es la técnica que se usa con mayor frecuencia, en el diagnóstico de la enfermedad en humanos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Sin embargo, esta técnica en estudios nacionales de pacientes con diarrea crónica y SIDA, demostró una sensibilidad de un 78,3% versus un 86,9% para ZN (Atías, 1998).

El medio diagnóstico más utilizado y de rutina en medicina veterinaria en nuestro país, es el de tinción de ZN en extendidos de heces.

4.6.3 Detección de ooquistes en agua:

Una de las limitaciones que existen para el monitoreo de este parásito, es que los métodos comúnmente usados para su detección, resultan muy complejos y costosos para su aplicación en el análisis de rutina, lo que plantea la necesidad de la búsqueda de métodos más económicos y prácticos, que permitan llevar a cabo el monitoreo y control de la contaminación parasitaria del agua (Arnedo *et al.*, 2008).

La norma de coliformes, no es suficiente como indicador de la presencia o viabilidad de ooquistes de *Cryptosporidium* en el agua. Al igual que quistes y ooquistes de otros protozoos, los ooquistes de este protozoario se encuentran presentes en bajo número, proporcionalmente, en el ambiente acuático. No se encuentran disponibles técnicas de cultivo *in vitro*, que aumenten el número de ooquistes previo a su identificación en agua potable. Por lo anterior, se deben tomar grandes volúmenes de agua para poder concentrar y detectar este parásito. Debido a la baja dosis infectante de *C. parvum* y *C. hominis* en humanos, es de gran relevancia poder concentrar los ooquistes presentes, de manera eficaz, para así identificar con precisión este protozoario (Smith y Nichols, 2010).

Son escasos los protocolos descritos en relación a la toma de muestras en este tipo de matriz, para la detección de *Cryptosporidium*, uno de ellos describe la recolección de grandes volúmenes de agua, de hasta 1.000 L, así como también pequeños volúmenes, de entre 10-50 L de agua. Generalmente la toma de estas muestras, se realiza en forma continua durante un periodo de tiempo definido, en un determinado caudal, filtrándose *in situ* a través de membranas filtros, que poseen un tamaño de poro que permita retener los ooquistes de *Cryptosporidium*, para posteriormente procesar las membranas en el laboratorio (Zanaro y Garbossa, 2008; Smith y Nichols, 2010).

Algunos métodos descritos incluyen la filtración, la separación inmunomagnética de ooquistes atrapados en las membranas de filtración y la detección, usando pruebas de inmunofluorescencia, mediante la tinción con 40,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), detectada a través de un microscopio de epifluorescencia y la determinación de la morfología interna, por microscopía de contraste (Smith y Nichols, 2010).

Con el fin de mejorar la sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos y como alternativa al diagnóstico convencional, se han desarrollado una variedad de protocolos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para muestras clínicas y ambientales (Zarlenga y Trout, 2004). En comparación con la microscopía, cada determinación individual mediante PCR insume más tiempo de manipulación, el costo es mayor, son necesarios controles internos adecuados y deben eliminarse los inhibidores enzimáticos presentes en las muestra (Morgan *et al.*, 1998; Zarlenga y Trout, 2004; Zanaro y Garbossa, 2008). Una ventaja del uso de las técnicas moleculares es que han provisto información sobre la variabilidad genética de *Cryptosporidium*, lo que permitió demostrar, precisamente, que *C. parvum* no es una especie uniforme, sino que abarca distintos genotipos (Xiao y Fayer, 2008; Zanaro y Garbossa, 2008).

V. OBJETIVO GENERAL.

Comparar la sensibilidad analítica de los protocolos microscópicos tradicionales, en la detección del protozooario zoonótico *Cryptosporidium parvum*, en muestras de agua inoculadas con este agente.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1.- Desarrollar un protocolo que permita recuperar, concentrar y detectar ooquistes de *C. parvum* inoculados en diferentes concentraciones de muestras de agua.

2.- Determinar y comparar la sensibilidad analítica (límite de detección), de las técnicas microscópicas en estudio.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

7.1 Agente zoonótico en estudio:

En el presente estudio **no se tomaron muestras biológicas humanas o animales**, ya que se utilizaron ooquistes de *C. parvum* de origen nacional, obtenidos de muestras de heces de humanos y de terneros diarreicos de la Región Metropolitana, conservadas en los Laboratorios de Parasitología de las Facultades de Medicina y de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, respectivamente. Estas muestras fueron recolectadas para estudios previos y en cada una de ellas, fue identificado el agente parasitario en estudio por ZN, AU, un método inmunocromatográfico y un ensayo de PCR especie-específico (trabajo enviado a publicación). De estas muestras ya procesadas, se utilizaron tres muestras de terneros y tres muestras humanas.

7.2 Contaminación o inoculación artificial de muestras de agua:

Los ooquistes de las muestras mencionadas, se inocularon en seis muestras de agua destilada, tres de ellas con ooquistes provenientes de terneros y las tres restantes con los de origen humano. El proceso de destilación del agua (por ebullición y condensación), asegura que el agua está libre de este agente parasitario. Sin embargo, de igual manera se consideró realizar los métodos diagnósticos microscópicos, a muestras de agua destilada pre y post inoculación.

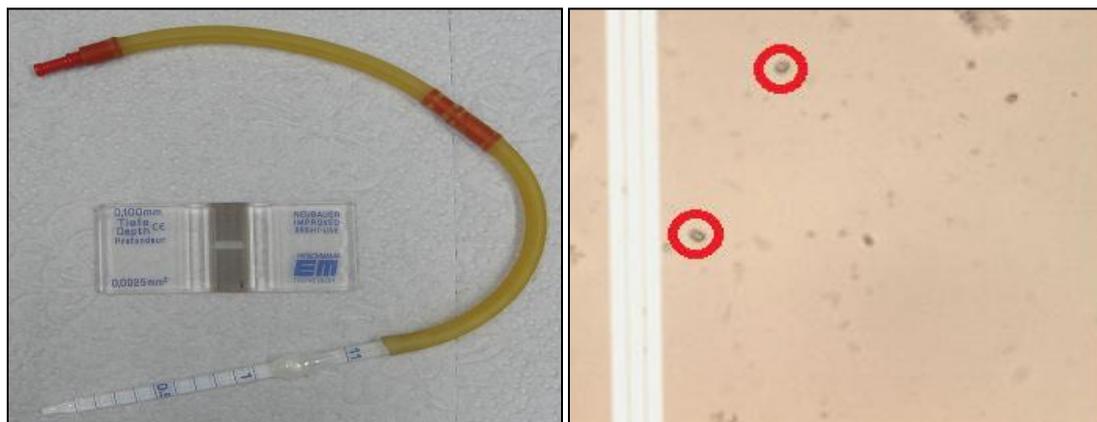
Para inocular los ooquistes de origen animal y humano, se tomaron 500 mg de cada muestra de heces y se re-suspendieron en 1 mL de agua destilada. Estos preparados, conformaron el material para determinar la concentración inicial de ooquistes. Para esto, se realizó un recuento en cámara de Neubauer del número de ooquistes presentes en la muestra (Figura 5) (Schalm *et al.*, 1981).

Luego, a través de diluciones al doble de las muestras de agua inoculadas, partiendo de una concentración de 10^6 ooquistes en 250 mL, se obtuvieron diferentes concentraciones del parásito (Cuadro 2). Las diluciones se realizaron hasta que el agente no fue detectado con las pruebas microscópicas en estudio.

Cuadro 2. Diluciones y concentraciones de ooquistes.

Dilución	Concentración
1 ^a	1.000.000 ooquistes
2 ^a	500.000 ooquistes
3 ^a	250.000 ooquistes
4 ^a	125.000 ooquistes
5 ^a	62.500 ooquistes
6 ^a	31.250 ooquistes
7 ^a	15.625 ooquistes
8 ^a	7.812,5 ooquistes
9 ^a	3.906,2 ooquistes
10 ^a	1.953,1 ooquistes
11 ^a	976,5 ooquistes
12 ^a	488,2 ooquistes

Figura 5. Camara de Neubauer Y Pipeta recuento; ooquistes en cámara de Neubauer.



7.3 Recuperación y concentración de los ooquistes inoculados en las muestras de agua (adaptado de Abramovich *et al.*, 2000):

Cada muestra de agua inoculada o contaminada artificialmente, con los ooquistes de *C. parvum* fue filtrada mediante un sistema de filtración MFS[®], con fuerza de vacío, para un volumen máximo de 300 mL de muestra, utilizando membranas de nitrocelulosa estériles de tamaño de poro de 0,2 μ y de un diámetro de 47 mm (MFS[®]) (Figura 6). Posteriormente, cada una de estas membranas se: (a) retiró y lavó en un tubo de centrífuga con 15 mL de agua destilada, con 0,5 % de Tween-20 y 0,2 % de dodecil sulfato de sodio (SDS) en partes iguales; (b) se rasparon y trituraron, mediante bisturí estéril; (c) todo el contenido se centrifugó a 1.500 g durante 15 min, descartando el sobrenadante, mientras que el pellet fue resuspendido en 1 mL de etanol 70%. De éste, se extrajeron 50 μ L con micropipeta y se realizó un extendido, para cada tinción, de 1 cm de largo por 0,5 cm de ancho en un portaobjetos, dejando secar a temperatura ambiente, para la posterior realización de las técnicas microscópicas en estudio. Esto último, se realizó en triplicado por cada dilución. El punto de corte para determinar cuál fue la última dilución considerada positiva, para cada método de tinción, se obtuvo de aquellas muestras en que al menos uno o dos extendidos del triplicado resultó negativo y los otros restantes positivos. Con cada una de estas muestras o diluciones seleccionadas se realizaron septuplicados, de manera tal que sólo se dio por positivo, aquella dilución en la que se obtuvo más del 50% de los extendidos con esta condición. Además, se incluyó un control positivo (muestra original humana o bovina) y dos controles negativos (del agua destilada pre inoculada y post inoculada, pero post filtrada), por cada vez que se realizaron los métodos microscópicos en estudio.

Figura 6. Sistema MFS[®], con fuerza de vacío; Membrana nitrocelulosa MFS[®].



7.4 Técnicas microscópicas tradicionales de tinción en estudio:

7.4.1 Ziehl-Neelsen modificada (Henriksen y Pohlenz, 1981; Fayer y Xiao, 2007) (Anexo I):

Una vez seco el volumen de la muestra (50µL) en un portaobjetos, se procedió a su tinción, asegurando la identificación y manteniendo el orden de cada lámina durante todo el proceso; luego se vació fucsina básica sobre los portaobjetos, hasta cubrirlos completamente. Cada lámina se calentó hasta que emitió vapores, pasando bajo ellas un algodón con alcohol encendido, cuidando de no hervir el colorante y dejando actuar durante 20 min. Posteriormente, se procedió a lavar la placa con agua corriente, hasta eliminar todo el exceso de colorante.

Luego sobre las láminas se agregó alcohol-ácido hasta cubrirlas, dejándolo actuar por no más de 30 seg, para luego lavar con agua corriente y así eliminar todo el exceso de producto.

Después de lavadas las láminas, se cubrieron con azul de metileno que se dejó actuar durante 2 a 5 min. Se lavó nuevamente, hasta eliminar todo el exceso de colorante.

Finalmente, cada lámina se dejó inclinada sobre papel absorbente, permitiendo su secado a temperatura ambiente. Una vez seco se observó al microscopio óptico, con aumento de 1000x, en aceite de inmersión.

7.4.2 Aureamina_(Fayer y Xiao, 2007) (Anexo II):

Una vez seco el extendido realizado en un portaobjetos, se procedió a su tinción, asegurando la identificación y manteniendo el orden de cada lámina durante todo el proceso. Luego se cubrió con una solución fenicada de Aureamina al 0,3% durante 10 minutos. Pasado ese tiempo se lavó con agua corriente, para posteriormente cubrir con alcohol-ácido, el cual se dejó actuar por 30 seg. Luego de un nuevo lavado con agua de la llave, se cubrió con Permanganato de Potasio al 0,1% por 30 seg. Se lavó con agua corriente, se agregó una gota de glicerina básica y se cubrió con un cubreobjetos, para leer la muestra al microscopio de epifluorescencia, con el filtro adecuado para observar la fluorescencia de la aureamina (color verde-anaranjado) con aumento de 400x.

7.5 Determinación comparativa de la sensibilidad analítica o del límite de detección de las técnicas microscópicas en estudio:

Con los resultados de las técnicas descritas en 7.4.1. y 7.4.2., se comparó cual fue la prueba que detectó la menor cantidad de ooquistes de *C. parvum*, en las muestras de agua inoculadas. Los resultados se expresaron en ooquistes por mL, siendo la técnica más sensible aquella capaz de detectar la menor cantidad de ooquistes/mL.

7.6 Bioseguridad:

Los procedimientos de bioseguridad contemplaron trabajar con antiparras, mascarillas, delantales, pecheras de plástico, etc. y para los residuos biológicos, los procedimientos fueron:

1.- Esterilización en autoclave de los desechos infecciosos de laboratorio (placas de petri, pipetas, tubos de cultivos, material de vidrio, etc.), estos fueron descontaminados utilizando una autoclave institucional, manipulado por personal calificado y certificado por ACHS (Asociación Chilena de Seguridad).

2.- Desinfección con químicos, que fundamentalmente fue alcohol yodado. Con éstos se descontaminaron las superficies y los aparatos, que no se podían esterilizar en autoclave.

3.- Incinerar, como método de eliminación de desechos patológicos. En la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, se dispone de un incinerador, el cual cumple con las normas ambientales vigentes, en cuanto a emisión de partículas y contaminantes químicos (se adjunta certificado de bioseguridad, otorgado al proyecto financiado, Anexo III).

VIII. RESULTADOS.

Obtenido el preparado inicial a partir de heces de terneros y humanos diarreicos, se determinó la concentración inicial de ooquistes a través del recuento en cámara de Neubauer, del número de ooquistes presentes en las muestras. Una vez procesadas las diluciones, descritas en material y métodos, se procedió a realizar los extendidos para aplicar las tinciones tradicionales en estudio, ZN y AU (Figura 7-8). Se hicieron 3 extendidos para cada dilución (triplicado), más un control positivo y un control negativo, pre y post filtración, por lo que en las 6 muestras en estudio, se realizaron un total de 468 extendidos, 78 por cada muestra procesada, divididos en 39 para la tinción de ZN y 39 para la tinción de AU.

Figura 7. Tinción de Ziehl-Neelsen. Ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, de terneros diarreicos, presentes en una muestra agua, previa inoculación artificial, 1000x. (Cámara Sony cyber-shot DSC-H20 zoom 10x).

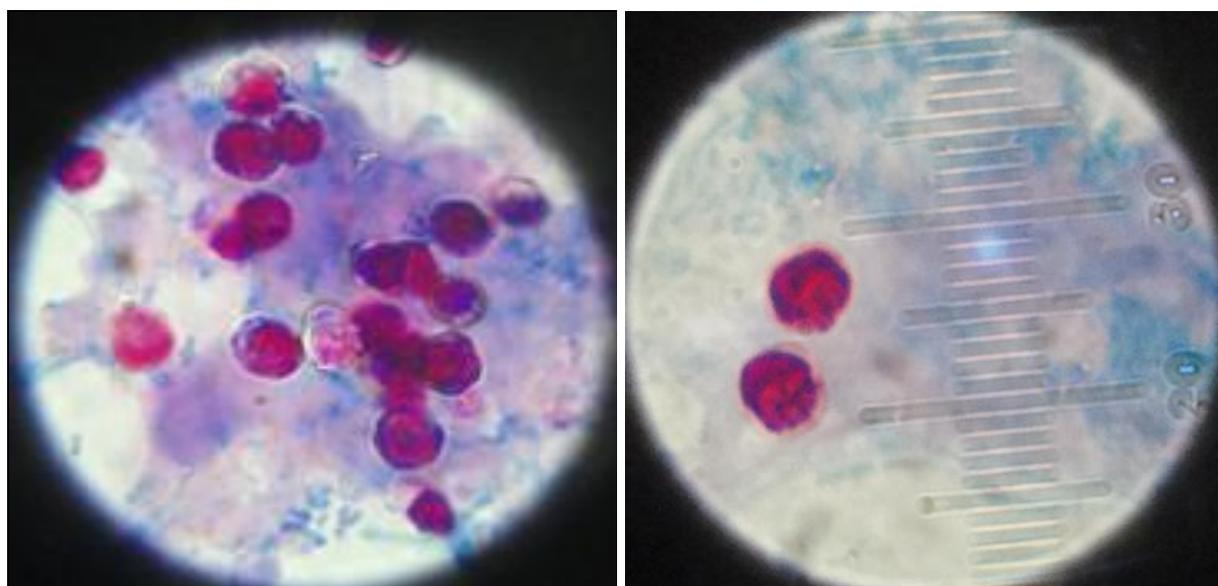
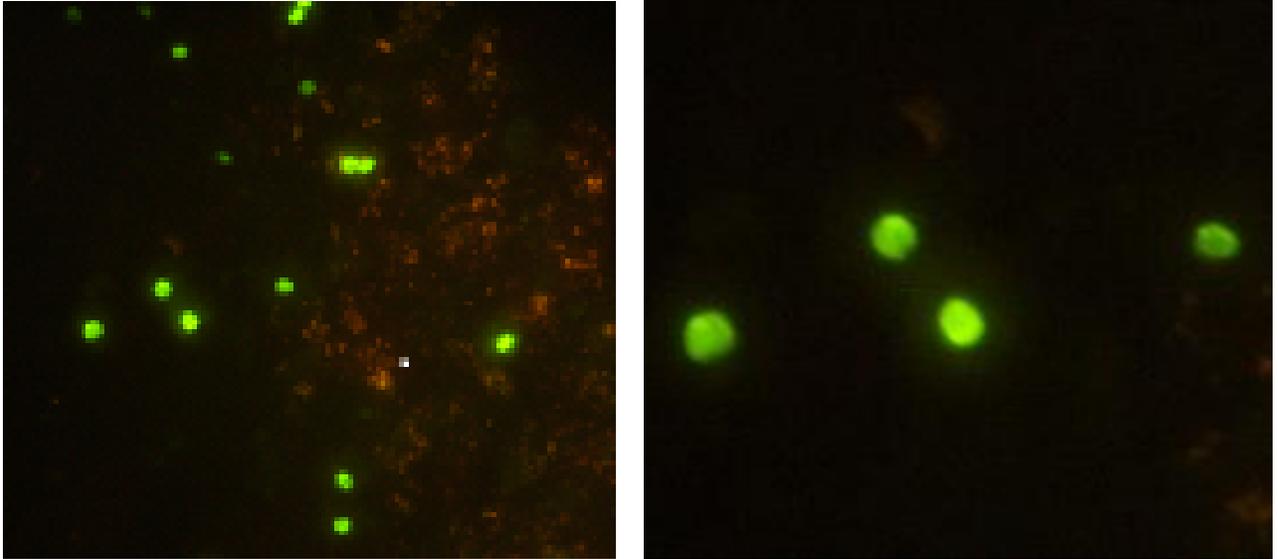


Figura 8. Tinción de Aureamina. Ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, de humanos diarreicos, presentes en una muestra agua, previa inoculación artificial, 400x. (Camara Sony cyber-shot DSC-H20 zoom 10x).



Se comparó la sensibilidad analítica de ambas tinciones, obteniéndose la mínima concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* que son requeridos para dar una muestra como positiva. Los resultados de este estudio, expresados en ooquistes/mL, demuestran que ambas tinciones tienen una sensibilidad analítica similar, ya que son capaces de detectar hasta la dilución de 1.953 ooquistes en 250 mL, es decir, 7 ooquistes /mL (Anexo IV). Estos resultados, se resumen en el cuadro a continuación (Cuadro 3):

Cuadro 3: Límite de detección de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* mediante las pruebas de Zielh Neelsen modificado (ZN) y Aureamina (AU), en muestras de agua destilada previamente inoculadas con el agente, de origen animal y humano.

Dilución	Ooquistes / 250 mL	Ooquistes / mL	ZN	AU
1 ^a	1.000.000	4.000	+	+
2 ^a	500.000	2.000	+	+
3 ^a	250.000	1.000	+	+
4 ^a	125.000	500	+	+
5 ^a	62.500	250	+	+
6 ^a	31.250	125	+	+
7 ^a	15.625	62,5	+	+
8 ^a	7.812	31,2	+	+
9 ^a	3.906	15,6	+	+
10 ^a	1.953	7,8	+	+
11 ^a	976	3,9	-	-
12 ^a	488	1,9	-	-

IX. DISCUSIÓN.

Dentro de las distintas técnicas diagnósticas, utilizadas para la detección de *Cryptosporidium* a nivel de laboratorio, los protocolos de rutina utilizan fundamentalmente la detección microscópica de ooquistes del parásito en heces, previa concentración, a través de técnicas de tinción como ZN (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004). Siendo éste en medicina veterinaria el método diagnóstico de elección (Georgi y Georgi, 1990; Barriga, 2002). En tanto que la detección del protozoo a través de la tinción de AU, ha sido utilizada casi exclusivamente en muestras de origen humano (Atías, 1998; Fayer, 2004).

Previo al estudio realizado por Díaz-Lee (2010), en Chile no existían antecedentes del uso de AU, para la detección de *Cryptosporidium* en medicina veterinaria. En dicho trabajo, se buscó comparar la sensibilidad de las tinciones de ZN y AU, para la detección de *Cryptosporidium* en heces de terneros diarreicos, de predios lecheros de la Región Metropolitana. Los resultados obtenidos fueron que AU, tendría una mayor sensibilidad en la detección de ooquistes, con respecto a ZN.

Así también en Chile, hasta la fecha, no existen antecedentes de laboratorios que realicen protocolos de detección microscópica, ni menos aún estudios de comparación de sensibilidad de estas, a partir de fuentes de agua. A nivel internacional, son escasos los estudios acerca del uso de estas técnicas en la detección del parásito en muestras ambientales, a pesar que existen antecedentes de la transmisión de este agente zoonótico por el agua. Uno de estos trabajos, es el de Arnedo *et al.* (2008), que utilizó dos pruebas microscópicas como son inmunofluorescencia directa (IFD) y ZN. Además, la pesquisa de *Cryptosporidium* en el agua potable, no es realizada como procedimiento de rutina, debido a que los métodos utilizados para el diagnóstico son engorrosos, de elevado costo y consumen mucho tiempo por parte de los operadores y Nichols, 2010).

Es por esta razón, que esta Memoria de Título se desarrolló con el objetivo de comparar la sensibilidad analítica de protocolos microscópicos tradicionales, en la detección del protozoo zoonótico *C. parvum*, aislado previamente de muestras de heces, de terneros y seres humanos a nivel nacional, en muestras de agua potable previamente filtradas y posteriormente contaminadas artificialmente con el agente.

En relación al primer objetivo específico planteado, se logró desarrollar un protocolo que permitió recuperar, concentrar y detectar ooquistes de *C. parvum*, a partir de muestras de agua inoculadas con diferentes concentraciones del agente, con las técnicas de tinción descritas.

Respecto al segundo objetivo específico, con los resultados obtenidos se determinó y comparó la sensibilidad analítica o límite de detección de cada una de las técnicas microscópicas en estudio, utilizadas en la detección del agente.

A partir de los resultados, se demuestra que ambas técnicas de tinción, son capaces de detectar concentraciones de ooquistes tan bajas como la dosis infectante, descritas para este parásito, es decir de 1 a 30 ooquistes (Dupont *et al.*, 1995; Guerrant, 1997; García, 1999; Okhuysen *et al.*, 1999; Fayer, 2000; Dillingham *et al.*, 2002; Zanaro *et al.*, 2008).

Además, se obtuvo que el uso de una u otra tinción en la pesquisa de este parásito en muestras de aguas, no se basaría en la sensibilidad de las mismas, sino en ventajas y desventajas metodológicas para su implementación. Tanto es así, que de acuerdo al análisis comparativo realizado en el presente trabajo, los resultados obtenidos de alguna forma, se contraponen con los resultados obtenidos por Díaz-Lee (2010), a pesar que dicho estudio trabajó en otra matriz y comparó ambas técnicas microscópicas mediante McNemar, lo que permitió detectar una diferencia estadísticamente significativa en la sensibilidad, siendo la tinción de AU más sensible que ZN, en la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

Sin embargo, los resultados analíticos del presente estudio, concuerdan con los del trabajo de Brook *et al.* (2008), quien en 29 muestras de heces de terneros sometidas a ambas técnicas de tinción, no obtuvo diferencias significativas. Así también, De Quadros *et al.* (2006), analizó 331 muestras de heces de animales domésticos, de distintas especies, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas, en la sensibilidad entre ambas técnicas.

Al respecto, se ha sugerido que la técnica de tinción de ZN, teñiría una pequeña proporción de los ooquistes presentes en una muestra, comparado con la técnica de AU (Brook *et al.*, 2008). Este mismo autor, estimó una sensibilidad aceptable para ambas técnicas de tinción. Sin embargo, en otro estudio, fue la tinción de AU el método escogido como de rutina, debido a que presentó una sensibilidad similar a una prueba comercial de inmunofluorescencia (Tee *et al.*, 1993).

En el estudio realizado por Arnedo *et al.*, (2008), en muestras de agua residual de plantas de tratamiento, la detección de *Cryptosporidium* spp. mediante métodos de tinción tradicionales, como ZN e IFD, arrojó como resultado que las concentraciones de ooquistes detectadas en todas las muestras del efluente final, fue superior a la dosis infectante conocida. Siendo ambas técnicas eficaces en la detección del agente, debido a que no se observaron diferencias importantes en las concentraciones detectadas por ambas, por lo que no se requiere el uso de técnicas de elevada sensibilidad como IFD, para poder realizar su detección en este tipo de muestras.

Las pruebas de diagnóstico basadas en la observación microscópica de aspectos morfológicos de los agentes infecciosos, tienen la desventaja de ser totalmente dependiente del operador y además, las técnicas que implican la tinción de la pared del ooquiste, no entregan información sobre la especie del organismo detectado (Wiedenmann *et al.*, 1998).

La principal ventaja de la técnica de tinción de ZN es su bajo costo, esto sumado a que los extendidos una vez teñidos, pueden ser conservados de forma permanente, a diferencia de la tinción de AU (Brook *et al.*, 2008). Además que este último método, requiere de un microscopio de epifluorescencia y la fluorescencia del fondo de la muestra podría representar un problema de lectura, si esta presenta una gran cantidad de detritos fecales (Weber *et al.*, 1991). Aún así, si se cuenta con el personal capacitado y el equipo necesario para la realización de la técnica de tinción de AU, esta es menos demorosa y de más fácil lectura.

Así mismo, con ZN como metodología diagnóstica, la principal desventaja que existe es el consumo de tiempo que requiere (Abe *et al.*, 2002). Por lo anterior, es necesario tener en cuenta el tiempo necesario de preparación previa al estudio, para la visualización de los ooquistes de *Cryptosporidium*, al igual que para llevar a cabo el recuento de ooquistes en la cámara de Neubauer.

El presente estudio es el primer trabajo a nivel nacional, en que estos métodos diagnósticos son utilizados en esta matriz. En esta etapa se logró desarrollar, estandarizar y comparar ambos protocolos microscópicos en la detección de ooquistes de este protozooario, en muestras de agua potable inoculadas artificialmente con el agente. Lo obtenido hasta la fecha, permite concluir que ambos métodos diagnósticos, así como los protocolos de inoculación, recuperación y el nivel de detección analítico de ambas técnicas, son eficaces. Por lo tanto, estas

pueden ser consideradas como la base para, en el futuro cercano, implementar métodos de muestreo de aguas naturalmente infectadas, así como de protocolos de diagnóstico más sensibles, como los moleculares, en muestras medio ambientales, como son las de agua superficiales.

Lo anterior, en virtud del valor que tiene y tendrá el agua en términos sanitarios, económicos y ecológicos, tomando en cuenta el papel primordial que juega esta, como vehículo transmisor de microorganismos causantes de enfermedades. En el caso específico de la criptosporidiosis, se debe tener en cuenta el aumento de factores que pueden provocar inmunodepresión en el organismo, lo cual es una condición preponderante en la presentación humana y animal de esta enfermedad (Fayer y Xiao, 2007). Por esto, es muy importante desarrollar protocolos de detección en muestras de agua, que permitan el monitoreo periódico de su calidad y para ello, es primordial que los organismos encargados de la disposición, del tratamiento y saneamiento de las aguas, así como los de salud pública, cuenten con técnicas apropiadas que le permitan llevar a cabo de una manera sencilla y económica estos análisis, en pro del beneficio de la sociedad, debido al carácter de zoonosis re-emergente de esta enfermedad (Almeida *et al.*, 2006; Sunnotel *et al.*, 2006).

Además, es necesario hacer énfasis en la importancia de incluir la detección de *Cryptosporidium* como indicador de la calidad del agua, ya sea en aguas tratadas o potabilizadas, debido a que los actuales parámetros de medición de calidad de esta, a nivel nacional, no consideran la pesquisa de este parásito. Lo anterior a pesar que está descrito, que su presencia en el agua potable, implica la presencia de material fecal en esta matriz y con esto la presencia de otros microorganismos contaminantes perjudiciales para el hombre y los animales (Abramovich *et al.*, 2000; Smith y Nichols, 2010), por lo que su hallazgo, podría ser utilizado como un indicador de calidad e inocuidad de agua potable.

X. CONCLUSIONES.

1. A partir de los resultados obtenidos, se puede afirmar que ambas técnicas de tinción en estudio poseen una sensibilidad analítica similar, debido a que ambas lograron detectar concentraciones de ooquistes similares.
2. La selección de una u otra tinción en la pesquisa de este parásito en muestras de aguas, debería basarse en las ventajas y desventajas metodológicas, para su implementación en el laboratorio de pesquisa.
3. Los protocolos realizados podrían ser usados como pruebas de tamiz para la pesquisa de *Cryptosporidium* en muestras de agua, tomando en consideración que el uso de estas tinciones para observar el parásito tiene un límite de sensibilidad $>$ a 1.900 ooquistes/250 mL de muestra de agua.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

- **ABE, N.; SAWANO, Y.; YAMADA, K.** 2002. *Cryptosporidium* infection in dogs in Osaka, Japan. *Vet. Parasitol.* 108: 185-193.
- **ABRAMOVICH, B.; LURÁ, M.C.; HAYE, M.A.; GILLI, M.I.; VAIRA, S.; CONTINI, L.** 2000. Parásitos en aguas y su relación con indicadores químicos y microbianos de contaminación. <http://libnet.unse.edu.ar/5Con/Rhid/T/06001.PDF> [Consulta agosto 2009]. 9pp.
- **ACHA, P.; SZYFRES, B.** 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 3^{era} ed. Ed. OPS. Washington, DC, USA. Vol. III. 23-27pp.
- **ALCAÍNO, H.; GORMAN, T.** 1999. Parásitos de animales domésticos en Chile. *Parasitol al Día.* 23: 33-41.
- **ALMEIDA, A.; DELGADO, M.; SOARES, S.; CASTRO, A.; MOREIRA, M.; MENDONCA, C.; CANADA, N.; CORREIRA DA COSTA, J.; COELHO, H.** 2006. Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Northern Portugal. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: 26-27.
- **ARNEDO, I.; BRACHO, M.; DIAZ-SUAREZ, O.; BOTERO, L.** 2008. Técnicas para la detección de *Cryptosporidium* spp. en sistemas de tratamiento de agua residual. *Kasmera*, 36: 120-128.
- **ATÍAS, A.** 1998. *Parasitología Médica.* Ed. Mediterráneo. Santiago, Chile. 146-151pp.
- **BARRIGA, O.** 1983. *Cryptosporidium*, una “nueva” coccidia intestinal de importancia médica. *Parasitol al Día.* 7: 119-121.
- **BARRIGA, O.** 2002. Capítulo 58C: La coccidiosis: C. Las criptosporidiasis. *In: Las Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos en la América Latina.* Ed. Germinal. Santiago, Chile. 187-188pp.
- **BOTERO, D.; RESTREPO, M.** 2003. *Parasitosis humanas.* 4^a ed. Editorial CIB. Medellín, Colombia. 506 pp.
- **BROOK, E. J.; CHRISTLEY, R. M.; FRENCH, N. P.; HART, C. A.** 2008. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle faeces. Comparison of three methods. *Lett. Appl. Microbiol.* 46: 26-31.

- **CAMA, V. A.; BERN, C.; ROBERTS, J.; CABRERA, L.; STERLING, C. R.; ORTEGA, Y.; GILMAN, R. H.; XIAO, L.** 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg. Infec. Dis.* 14: 1567-1574.
- **CASTRO-HERMIDA, J.; GONZÁLEZ-LOSADA, Y.; ARES-MAZÁS, E.** 2002a. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Vet. Parasitol.* 106: 1-10.
- **CASTRO-HERMIDA, J.; GONZÁLEZ-LOSADA, Y.; MEZO-MENÉNDEZ, M.; ARES-MAZÁS, E.** 2002b. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Vet. Parasitol.* 106: 11-17.
- **CASTRO-HERMIDA, J.; PORS, I.; MÉNDEZ-HERMIDA, F.; ARES-MAZÁS, E.; CHARTIER, C.** 2006. Evaluation of two comercial disinfectants on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet. J.* 171: 340-345.
- **CORDERO DEL CAMPILLO, M.; ROJO, F. A.; MARTÍNEZ, A.; SÁNCHEZ, C.; HERNÁNDEZ, S.; NAVARRETE, J.; DÍEZ, P.; QUIROZ, H.; CARVALHO, M.** 1999. *Parasitología Veterinaria*. Ed. Mc Graw-Hill, Interamericana. Madrid, España. 213-221pp.
- **CORIS BIOCONCEPT.** 2001. *Crypto-Strip (C-1005)*. Test inmunocromatográfico *in vitro* para detectar oocistos de *Cryptosporidium parvum* em las materias fecales. [Manual de uso]. Belgium, Coris Bioconcept. 4pp.
- **CURRENT, W. L.** 1985. Cryptosporidiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187: 1334-1338.
- **DE QUADROS, R.; MARQUES, S.; AMENDOEIRA, C.; DE SOUZA, L.; AMENDOEIRA, P.; COMPARIN, C.** 2006. Detection of *Cryptosporidium* oocysts by auramine and Ziehl Neelsen staining methods. *Parasitol. Latinoam.* 61: 117-120.
- **DE LA FUENTE, R.; LUZÓN, M.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; GARCÍA, A.; CID, D.; ORDEN, J. A.; GARCÍA, S.; SANZ, R.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.** 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Vet. Parasitol.* 80: 179-185.

- **DEL COCO, V.F.; CÓRDOBA, M.A.; BASUALDO, J.A.** 2009. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Rev. Argent. Microbiol.* 41: 185-196.
- **DIAZ-LEE, A.** 2010. Diagnóstico comparativo de *Cryptosporidium* spp. mediante las tinciones de ziehl-neelsen y de aureamina en heces de terneros diarreicos de rebaños lecheros de la región metropolitana, Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac Medicina Veterinaria. 52 pp.
- **DILLINGHAM, R.; LIMA, A.; GUERRANT, R.** 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microb. Infect.* 4: 1059-1066.
- **DUPONT, H.L.; CHAPPELL, C.L.; STERLING, C.R.; OKHUYSEN, P.C.; ROSE, J.B.; JAKUBOWSKI, W.** 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* 332: 855–859.
- **FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON S.** 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30: 1305–1322.
- **FAYER, R.** 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol.* 126: 37-56.
- **FAYER, R.** 2009. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124: 90–97
- **FAYER, R.; XIAO, L.** 2007. *In: Cryptosporidium and Cryptosporidiosis.* Fayer and Xiao. 2^a ed. Ed CRC Press. Florida, USA. 576 pp.
- **FENG, Y.; ORTEGA, Y.; HE, G.; DAS, P.; XU, M.; ZHANG, X.; FAYER, R.; GATEI, W.; CAMA, V.; XIAO, L.** 2007. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet. Parasitol.* 144: 1-9.
- **FREDES, F., RAFFO, E., MUÑOZ, P.** 2007. First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in stool of Adelie penguin from the Antarctic using acid-fast stain. *Antarct. Sci.* 19: 437-438.
- **GARCÍA, L.S.** 1999. Practical Guide to Diagnostic Parasitology. Ed. ASM. Press. Washington.D.C., USA. 349pp.
- **GARCÍA, L.S.** 2001. Diagnostic Medical Parasitology. 4^a ed. Ed. ASM. Press. Washington DC., USA. 1092 pp.

- **GARCIA, L. S.; BRUCKNER, D.A.** 1988. Diagnostic Medical Parasitology. Ed. ASM. Press. Washington.D.C., USA. 500pp.
- **GEORGI, J. R.; GEORGI, M. E.** 1990. Parasitology for Veterinarians. 5^a ed. Ed. Saunders Company. USA. 84-95pp
- **GÓMEZ-COUSO, H.; AMAR, C. F. L.; Mc LAUHLIN, J.; ARES-MAZÁS, E.** 2005. Characterization of a *Cryptosporidium* isolate from water buffalo (*Bubalus bubalis*) by sequencing of a fragment of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene (COWP). Vet. Parasitol. 131: 139-144.
- **GORMAN, T; ALCAÍNO, H; SANTELICES, J.** 1989. *Cryptosporidium* y otras coccidias intestinales en terneros de lechería. Región Metropolitana. Chile. Arch. Med. Vet. 21: 29-34.
- **GUERRANT, R.L.** 1997. Cryptosporidiosis: An Emerging, Highly Infectious Threat. Emerg. Infect. Dis. 3: 51-57.
- **HASHIM, A.; CLYNE, M.; MULCAHY, G.; AKIYOSHI, D.; CHALMERS, R.; BOURKE, B.** 2004. Host cell tropism underlies species restriction of human and bovine *Cryptosporidium parvum* genotypes. Infect. Immun. 72: 6125-6131.
- **HENRIKSEN, S.A.; POHLENZ, J.F.** 1981. Staining of Cryptosporidia by a modified ziehl neelsen technique. Acta. Vet. Scand. 22: 594-596.
- **KATO, S.; JENKINS, M.; FOGARTY, E.; BOWMAN, D.** 2002. Effects of freeze-thaw events on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in soil. J. Parasitol. 88: 718-722.
- **KIRBY, R.M.; BARTRAM, J.; CARR, R.** 2003. Water in food production and processing: quantity and quality concerns. Food Control 14: 283–299.
- **KREWSKI, D.; BALBUS, J.; BUTLER-JONES, D.; HAAS C.N; ISAAC-RENTON, J.; ROBERTS, K.J; SINCLAIR, M.** 2004. Managing the microbiological risks of drinking water. J Toxicol. Environ. Health A. 67:1591–1617.

- **LENG, X.; MOSIER, D.; OBERST, R.** 1996. Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. Appl. Environ. Microbiol. 62: 643-647.
- **LUNA, S.; REYES, L.; CHINCHILLA, M.; CATARINELLA, G.** 2002. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp en aguas superficiales de Costa Rica. Parasitol. Latinoam. 57: 63-65.
- **MADORE, M.S.; ROSE, J.B.; GERBA, C.H.; ARROWOOD, M.J.; STERLING, CH.** 1987. Occurrence of *Cryptosporidium* in sewage effluents and selected surface waters. J. Parasitol. 73: 702-705.
- **MERCADO, R.** 1992. Aspectos epidemiológicos y de diagnóstico de la criptosporidiosis humana en Chile. Bol. Chil. Parasitol. 47: 30-2.
- **MERCADO, R.; BUCK, G.; MANQUE, P.; OZAKI, L.S.** 2007. *Cryptosporidium hominis* infection of the human respiratory tract. Emerg. Infect. Dis. 13: 462-464.
- **MORGAN, U.M.; PALLANT, L.; DWYER B.W.; FORBES D.A.; RICH, G.; THOMPSON, R.C.** 1998. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. J. Clin. Microbiol. 36: 995-998.
- **NEIRA, P.** 2005. Acerca de *Cryptosporidium* spp en Chile. Rev. Med. Chil. 133: 847-849.
- **NIME, F.A.; BUREK, J.D.; PAGE, D.N.; HOLCHER, M.A.; YARDLEY, J.H.** 1976 Acute enterocolitis in human going infected with the protozoan *Cryptosporidium*. Gastroenterology. 70: 592-598.
- **OKHUYSEN, P.C.; CHAPPELL, C.L.; CRABB, J.H.; STERLING, C.R.; DUPONT, H.L.** 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. J. Infect. Dis. 180: 1275–1281.
- **PINTAR, K.D.M.; FAZIL, A.; POLLARI, F.; CHARRON, D.F.; WALTER-TOEWS, D.; MCEWEN, S.A.** 2010. A risk assessment model to evaluate the role of fecal contamination in recreational water on the incidence of cryptosporidiosis at the community level in Ontario. Risk. Anal. 30: 49-53.

- **SANTÍN, M.; TROUT, J.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R.** 2004. Prevalence and age related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.* 122: 103-117.
- **SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROLL, E.J.** 1981. *Hematología Veterinaria*. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 857p.
- **SMITH, H.; NICHOLS, R.** 2010. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. *Exp. Parasitol.* 124: 61-79.
- **SOULSBY, E.** 1987. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7^a ed. Nueva editorial Interamericana. Mexico, DF. 823pp.
- **STURBAUM, G.; REED, C.; HOOVER, P.; JOST, H.; MARSHALL, M.; STERLING, C.** 2001. Species-specific, nested PCR-restriction fragment length polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microb.* 67: 2665-2668.
- **SUNNOTEL, O.; SNELLING, X.; MOULE, K.; MOORE, J.E.; CHERIE MILLAR, B.; DOOLEY, J.S.G.; LOWERY, C.J.** 2006. Rapid and sensitive detection of single *Cryptosporidium* oocysts from archived glass slides. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3285-3291.
- **TEE, G.H.; MOODY, A.H.; COOKE, A.H.; CHIODINI, P.L.** 1993. Comparison of techniques for detecting antigens of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in faeces. *J. Clin. Pathol.* 46: 555-558.
- **THOMPSON, R.C.A.; OLSON, M.E.; ZHU, G.; ENOMOTO, S.; ABRAHAMSEN, M. S.; HIJJAWI, N. S.** 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Adv. Parasitol.* 59: 77-139.
- **TYZZER, E. E.** 1910. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. Et sp. Nov.), of the gastric glands of the common Mouse. *J. Med. Res.* 18: 487-509.
- **UNGAR, B.L.P.** 1990. Cryptosporidiosis in humans (*Homo sapiens*). In : Dubey, J.P.; Speer, C.A. Fayer, R. Eds. *Cryptosporidiosis of man and animals*. Ed. CRC press. Florida, USA. 59-82pp.

- **URIBARREN, T.** 2010. Criptosporidiosis (o criptosporidiasis). [en línea] <<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/protozoos/cryptosporidiosis.php>> [consulta: 25-07-2010]. 9pp.
- **WEBER, R.; BRYAN, R.; BISHOP, H.; WAHLQUIST, S.; SULLIVAN, J.; JURANEK, D.** 1991. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1323-1327.
- **WIEDENMANN, A.; KRUGER, P.; BOTZENHART, K.** 1998. PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples-a review of published protocols and current developments. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21: 150-166.
- **WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2009. Risk assessment of *Cryptosporidium* in drinking water. [en línea] <http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/cryptoRA/en/index.html> [consulta: 25-07-2010]. 143pp.
- **XIAO, L.; FAYER, R.** 2008. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and Giardia and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.* 38: 1239-1255.
- **XIAO, L.; RYAN, U.M.** 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17: 483-90.
- **YODER, J.; BEACH, M.** 2010. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. *Exp. Parasitol.* 124: 31-39.
- **ZANARO, N.L.; GARBOSSA, G.** 2008. Cryptosporidium: cien años después. [en línea]. <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572008000200004&lng=es&nrm=iso> [Consulta junio 2009]. 106pp.
- **ZARLENGA, D.S.; TROUT, J.M.** 2004. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Vet. Parasitol.* 126: 195-217.

ANEXOS.

Anexo I.

Tinción de ZN (Henriksen y Pohlenz, 1981; Fayer y Xiao, 2007).

- **Reactivos:** Azul de metileno, ácido acético glacial, ácido clorhídrico, alcohol etílico 95%, fucsina básica, fenol cristalizado, agua destilada.

- **Preparación de tinciones:**

• Fucsina

- Fucsina básica 10 g.
- Alcohol etílico 95% 100 ml.
- Fenol cristalizado (*) 50 ml.
- Agua destilada c.s.p. 1000 ml.

(*) Fundir a baño María el fenol cristalizado, agregando 10% de agua destilada y de éste medir 50 ml (aproximadamente 50 g).

Preparación: disolver la fucsina en el alcohol y luego agregar el fenol disuelto en agua destilada tibia.

• Azul de metileno

- Azul de metileno 2 g.
- Acido acético glacial 50 ml.
- Agua destilada c.s.p. 1000 ml.

• Alcohol ácido

- Ácido clorhídrico 30 ml.
- Alcohol etílico 970 ml.

Anexo II.

Tinción de AU (Fayer y Xiao, 2007).

- **Reactivos:** Aureamina, fenol en cristales, permanganato de potasio, ácido clorhídrico, alcohol etílico 95%, buffer pH 9,5, glicerina destilada.

- **Preparación de tinciones:**

• Aureamina

- Aureamina 30 mg.

- Fenol 3 g.

- Agua destilada c.s.p. 100 ml.

• Permanganato de potasio

- Permanganato de potasio 100 mg.

- Agua destilada c.s.p. 100 ml.

(Mantener ambas soluciones en botella ámbar).

• Alcohol ácido

- Ácido clorhídrico 30 ml.

- Alcohol etílico 95% 970 ml.

• Glicerina para fluorescencia

- Glicerina 90 ml.

- Buffer pH 9,5 10 ml.

Anexo III.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

CERTIFICADO Nº 027/2009

Con relación a los procedimientos propuestos en el Proyecto de Investigación titulado **"Comparación de la sensibilidad analítica de protocolos microscópicos tradicionales y uno molecular (PCR) en la detección del protozoo zoonótico *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua inoculadas con el agente"**, cuyo Investigador Responsable es el Dr. Fernando Fredes, el Comité Institucional de Bioseguridad Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, certifica:

"El investigador responsable señala la utilización de antiparras, mascarillas, delantales, pecheras, autoclavado de materiales contaminados, desinfectantes tradicionales e incineración cuando amerite. El laboratorio cumple con el nivel de Bioseguridad 2 para el trabajo con *Cryptosporidium*".

Con los antecedentes expuestos, este Comité estima que el proyecto se ajusta convenientemente con las especificaciones contenidas en el Manual de Normas de Bioseguridad editado por CONICYT versión 2008 y. previenen el riesgo para las personas, animales y ambiente".

Se extiende el presente certificado para ser presentado al X Concurso FIV 2009.


Dr. HÉCTOR ALCAÍNO CONZADOR
Decano
Presidente
Comité de Bioseguridad Animal



SANTIAGO, 25 de agosto de 2009

Anexo IV.

Cuadro 1. Resultados ZN muestra N° 67, ternero.

Muestra N° 67 ternero, ZN	Extendido 1	Extendido2	Extendido 3	Septuplicado
Control positivo	+			
Control negativo pre filtración	-			
Control negativo post filtración	-			
Inoculación 1000.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 500.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 250.000 ooq	+	+	+	
Inoculación 125000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 62500 ooq	+	+	+	
Inoculación 31250 ooq.	+	+	+	
Inoculación 15625 ooq.	+	+	+	
Inoculación 7812,5 ooq.	+	+	+	
Inoculación 3906, 25 ooq.	+	-	-	+
Inoculación 1953,124 ooq.	+	+	-	+
Inoculación 976,5 ooq.	-	-	-	
Inoculación 488,2 ooq.	-	-	-	

Cuadro 2. Resultados AU muestra N° 67, ternero.

Muestra N° 67 ternero, AU	Extendido 1	Extendido2	Extendido 3	Septuplicado
Control positivo	+			
Control negativo pre filtración	-			
Control negativo post filtración	-			
Inoculación 1000.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 500.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 250.000 ooq	+	+	+	
Inoculación 125000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 62500 ooq	+	+	+	
Inoculación 31250 ooq.	+	+	+	
Inoculación 15625 ooq.	+	+	+	
Inoculación 7812,5 ooq.	+	+	+	
Inoculación 3906, 25 ooq.	+	+	+	
Inoculación 1953,124 ooq.	+	+	+	
Inoculación 976,5 ooq.	-	-	-	
Inoculación 488,2 ooq.	-	-	-	

Cuadro 3. Resultados ZN muestra N° 60, ternero.

Muestra N° 60 ternero, ZN	Extendido 1	Extendido2	Extendido 3	Septuplicado
Control positivo	+			
Control negativo pre filtración	-			
Control negativo post filtración	-			
Inoculación 1000.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 500.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 250.000 ooq	+	+	+	
Inoculación 125000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 62500 ooq	+	+	+	
Inoculación 31250 ooq.	+	+	+	
Inoculación 15625 ooq.	+	+	+	
Inoculación 7812,5 ooq.	+	+	+	
Inoculación 3906, 25 ooq.	+	+	+	
Inoculación 1953,124 ooq.	+	+	-	+
Inoculación 976,5 ooq.	+	-	-	-
Inoculación 488,2 ooq.	-	-	-	

Cuadro 4. Resultados AU muestra N° 60, ternero.

Muestra N° 60 ternero, AU	Extendido 1	Extendido2	Extendido 3	Septuplicado
Control positivo	+			
Control negativo pre filtración	-			
Control negativo post filtración	-			
Inoculación 1000.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 500.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 250.000 ooq	+	+	+	
Inoculación 125000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 62500 ooq	+	+	+	
Inoculación 31250 ooq.	+	+	+	
Inoculación 15625 ooq.	+	+	+	
Inoculación 7812,5 ooq.	+	+	+	
Inoculación 3906, 25 ooq.	+	+	+	
Inoculación 1953,124 ooq.	+	+	+	
Inoculación 976,5 ooq.	+	-	-	-
Inoculación 488,2 ooq.	-	-	-	

Cuadro 5. Resultados ZN muestra N° 143, ternero.

Muestra N° 143 ternero, ZN	Extendido 1	Extendido2	Extendido 3	Septuplicado
Control positivo	+	+	+	
Control negativo pre filtración	+	+	+	
Control negativo post filtración	+	+	+	
Inoculación 1000.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 500.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 250.000 ooq	+	+	+	
Inoculación 125000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 62500 ooq	+	+	+	
Inoculación 31250 ooq.	+	+	+	
Inoculación 15625 ooq.	+	+	+	
Inoculación 7812,5 ooq.	+	+	+	
Inoculación 3906, 25 ooq.	+	+	+	
Inoculación 1953,124 ooq.	+	+	+	
Inoculación 976,5 ooq.	+	+	-	-
Inoculación 488,2 ooq.	-	-	-	

Cuadro 6. Resultados AU muestra N° 143, ternero.

Muestra N° 143 ternero, AU	Extendido 1	Extendido2	Extendido 3	Septuplicado
Control positivo	+	+	+	
Control negativo pre filtración	+	+	+	
Control negativo post filtración	+	+	+	
Inoculación 1000.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 500.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 250.000 ooq	+	+	+	
Inoculación 125000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 62500 ooq	+	+	+	
Inoculación 31250 ooq.	+	+	+	
Inoculación 15625 ooq.	+	+	+	
Inoculación 7812,5 ooq.	+	+	+	
Inoculación 3906, 25 ooq.	+	+	+	
Inoculación 1953,124 ooq.	+	+	+	
Inoculación 976,5 ooq.	-	+	-	-
Inoculación 488,2 ooq.	-	-	-	

Cuadro 7. Resultados ZN muestra N° 3, humano.

Muestra N°3 humano, ZN	Extendido 1	Extendido2	Extendido 3	Septuplicado
Control positivo	+			
Control negativo pre filtración	-			
Control negativo post filtración	-			
Inoculación 1000.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 500.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 250.000 ooq	+	+	+	
Inoculación 125000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 62500 ooq	+	+	+	
Inoculación 31250 ooq.	+	+	+	
Inoculación 15625 ooq.	+	+	+	
Inoculación 7812,5 ooq.	+	+	+	
Inoculación 3906, 25 ooq.	-	-	+	+
Inoculación 1953,124 ooq.	+	+	+	
Inoculación 976,5 ooq.	-	-	-	
Inoculación 488,2 ooq.	-	-	-	

Cuadro 8. Resultados AU muestra N° 3, humano.

Muestra N°3 humano, AU	Extendido 1	Extendido2	Extendido 3	Septuplicado
Control positivo	+			
Control negativo pre filtración	-			
Control negativo post filtración	-			
Inoculación 1000.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 500.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 250.000 ooq	+	+	+	
Inoculación 125000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 62500 ooq	+	+	+	
Inoculación 31250 ooq.	+	+	+	
Inoculación 15625 ooq.	+	+	+	
Inoculación 7812,5 ooq.	+	+	+	
Inoculación 3906, 25 ooq.	+	+	-	+
Inoculación 1953,124 ooq.	+	-	+	+
Inoculación 976,5 ooq.	-	-	-	
Inoculación 488,2 ooq.	-	-	-	

Cuadro 9. Resultados ZN muestra N° 2, humano.

Muestra N°2 humano, ZN	Extendido 1	Extendido2	Extendido 3	Septuplicado
Control positivo	+			
Control negativo pre filtración	-			
Control negativo post filtración	-			
Inoculación 1000.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 500.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 250.000 ooq	+	+	+	
Inoculación 125000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 62500 ooq	+	+	+	
Inoculación 31250 ooq.	+	+	+	
Inoculación 15625 ooq.	+	+	+	
Inoculación 7812,5 ooq.	+	+	+	
Inoculación 3906, 25 ooq.	+	+	+	
Inoculación 1953,124 ooq.	+	+	+	
Inoculación 976,5 ooq.	+	-	-	-
Inoculación 488,2 ooq.	-	-	-	

Cuadro 10. Resultados AU muestra N° 2, humano.

Muestra N°2 humano, AU	Extendido 1	Extendido2	Extendido 3	Septuplicado
Control positivo	+			
Control negativo pre filtración	-			
Control negativo post filtración	-			
Inoculación 1000.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 500.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 250.000 ooq	+	+	+	
Inoculación 125000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 62500 ooq	+	+	+	
Inoculación 31250 ooq.	+	+	+	
Inoculación 15625 ooq.	+	+	+	
Inoculación 7812,5 ooq.	+	+	+	
Inoculación 3906, 25 ooq.	+	+	+	
Inoculación 1953,124 ooq.	+	+	-	+
Inoculación 976,5 ooq.	-	-	-	
Inoculación 488,2 ooq.	-	-	-	

Cuadro 11. Resultados ZN muestra N° 6, humano.

Muestra N°6 humano, ZN	Extendido 1	Extendido2	Extendido 3	Septuplicado
Control positivo	+			
Control negativo pre filtración	-			
Control negativo post filtración	-			
Inoculación 1000.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 500.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 250.000 ooq	+	+	+	
Inoculación 125000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 62500 ooq	+	+	+	
Inoculación 31250 ooq.	+	+	+	
Inoculación 15625 ooq.	+	+	+	
Inoculación 7812,5 ooq.	+	+	+	
Inoculación 3906, 25 ooq.	+	+	+	
Inoculación 1953,124 ooq.	+	+	+	
Inoculación 976,5 ooq.	-	-	-	
Inoculación 488,2 ooq.	-	-	-	

Cuadro 12. Resultados AU muestra N° 6, humano.

Muestra N°6 humano, AU	Extendido 1	Extendido2	Extendido 3	Septuplicado
Control positivo	+			
Control negativo pre filtración	-			
Control negativo post filtración	-			
Inoculación 1000.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 500.000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 250.000 ooq	+	+	+	
Inoculación 125000 ooq.	+	+	+	
Inoculación 62500 ooq	+	+	+	
Inoculación 31250 ooq.	+	+	+	
Inoculación 15625 ooq.	+	+	+	
Inoculación 7812,5 ooq.	+	+	+	
Inoculación 3906, 25 ooq.	+	+	+	
Inoculación 1953,124 ooq.	+	+	+	
Inoculación 976,5 ooq.	+	-	-	-
Inoculación 488,2 ooq.	-	-	-	