

IMPORTANCIA DE LA DETECCIÓN DEL PROTOZOARIO ZONÓTICO
Cryptosporidium parvum EN MUESTRAS DE AGUA EN CHILE.

ROBERTO MOLINA, M.V.¹ RUBEN MERCADO, T.M., M.Sc., PhD², y FERNANDO
FREDES, M.V., M.Sc., PhD¹

¹Laboratorio de Parasitología. Depto. Medicina Preventiva Animal. Facultad de Ciencias
Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.

²Unidad Docente de Parasitología. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Email: ffredes@uchile.cl

Financiamiento: Proyecto FIV 12101401.9102.006

RESUMEN

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria del tracto digestivo producida por protozoos del género *Cryptosporidium*. Aunque las especies de este agente se han descrito desde comienzos del siglo veinte, solo a fines de éste, se ha reconocido como un patógeno ampliamente distribuido y como una amenaza para la salud pública. En los seres humanos y algunas especies animales, es considerado un agente emergente dado su reciente hallazgo en nuevas áreas geográficas del mundo o por su descripción en nuevas especies animales. En tanto que también se ha reportado su re emergencia por el aumento de la prevalencia de este patógeno en poblaciones humanas o animales. El primer brote de criptosporidiosis transmitido a través del agua, fue descrito en 1984, y desde ese año numerosos autores han evidenciado la presencia de este endoparásito en aguas de superficie, aguas de piscina, aguas residuales no tratadas e incluso en redes de agua potable, sugiriendo su rol como agente etiológico de diarrea. Su hallazgo frecuente en el agua potable, evidencia que los métodos de potabilización del agua no serían completamente eficientes en la separación o inactivación de este endoparásito. La persistencia y diseminación de éste protozoo en el ambiente y el agua potable se sustenta en tres hechos biológicos: (1) Sus ooquistes son inmediatamente infectantes, (2) tienen un tamaño pequeño y (3) resisten las condiciones medio ambientales, tanto como la acción de desinfectantes convencionales, así como los procesos físicos de tratamientos de aguas. Los métodos de diagnóstico de laboratorio son diversos y pueden variar según el origen de la muestra. Así por ejemplo existen protocolos y estudios tanto de técnicas microscópicas, como inmuocromatográficas y moleculares como PCR, para ser utilizados tanto en muestras del medio ambiente como en aquellas provenientes de pacientes. El desarrollo de estas últimas técnicas para el diagnóstico, ha permitido identificar a *Cryptosporidium hominis* y *C. parvum* como aquellos que con mayor prevalencia infectan al hombre. En Chile, es un agente endémico y está descrito en una serie de animales domésticos, así como también en los seres humanos. Si bien, los estudios de esta parasitosis se iniciaron en humanos y animales a mediados de la década de los 80', solo recientemente existen antecedentes bibliográficos de laboratorios que han realizado protocolos de detección de este agente zoonótico en esta matriz.

Palabras claves: *Cryptosporidium*, agua, zoonosis.

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a parasitic disease of the digestive tract caused by protozoa of the genus *Cryptosporidium*. Species of this agent have been reported since the beginning of the twentieth century. Just at the end of it, it has been recognized as a pathogen widely distributed as a threat to public health. In human beings and other animal species, is considered an emerging or re-emerging infectious agent. In 1984, the first outbreak of cryptosporidiosis transmitted through water, was described. Since then, many authors have shown the presence of this endoparasite in surface water, pool water, untreated wastewater and even drinking water, suggesting its role as a causative agent of diarrhea. Also there is evidence that water purification methods would not be completely efficient to remove or inactivate this endoparasite. The persistence and spread of this protozoan in the environment and drinking water are based on three biological conditions: 1) Its oocysts are immediately infectious, 2) it have a small size and 3) it have resistance to the environmental conditions, as well as the action of disinfectants and physical processes of water purification treatment. The laboratory diagnostic methods are diverse and can vary according to the origin of the samples. Microscopic, immunological and molecular protocols can be used in either patients or environmental samples. The development of molecular diagnostic technique has allowed the identification of *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* witch infections have the highest prevalence in human beings. In Chile, this parasitic disease is endemic infecting human domestic and wildlife animals. Studies of cryptosporidiosis in humans and livestock animals began in the mid-80's', but only recently some national laboratories develop protocols to study and detect this zoonotic agent in this matrix.

Keywords: *Cryptosporidium*, water, zoonosis.

INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium fue descrito por primera vez parasitando el tracto digestivo de ratones por Tyzzer en 1907, ya en 1955 se describe la primera especie de este género que causa enfermedad y muerte en aves. Sin embargo, permaneció como una curiosidad biológica hasta los años '70, ya que al comienzo de esta década se reporta el primer caso de criptosporidiosis clínica en un ternero, el que fue publicado en 1971(Panciera *et al.*, 1971)). En tanto que la criptosporidiosis humana fue informada por primera vez en 1976, siendo este endoparásito encontrado en la biopsia rectal de una niña (Nime *et al.*, 1976)).

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria del tubo digestivo producida por protozoos del género *Cryptosporidium*. 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 aves de corral, ganado, animales de compañía y de vida silvestre, y se ha transformado en 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, 2008) incluida la Antártica (Fredes *et al.*, 2007). En los humanos y algunos animales, es considerada una zoonosis re-emergente (Almeida *et al.*, 2006; Sunnotel *et al.*, 2006; Diaz-Lee *et al.*, 2010).

El género *Cryptosporidium* comprende protozoos que se desarrollan y multiplican en las células epiteliales de este aparato 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: asexuada (esquizogonia) y sexuada (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 la 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; Krewski *et al.*, 2004; Fayer, 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 piscinas, aguas de ríos e incluso redes de agua potable (Atías, 1998; García, 2001; Fayer, 2004; Fayer y Xiao, 2008).

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 del protozooario.

En medicina veterinaria los métodos diagnósticos de rutina de la criptosporidiosis, son la tinción de Zielh Neelsen modificada (ZN) y la de Aureamina (AU), ambas basadas en la observación microscópica de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en extendidos de heces, previamente concentradas, debido a las propiedades ácido alcohol resistente de estas estructuras biológicas AU 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, 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 en la detección del parásito en muestras ambientales, a pesar que existen antecedentes de la transmisión de este agente zoonótico por el agua.

Etiología:

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 (1907), 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 denota poca especificidad de hospedero. Se describe por ejemplo, que *C. parvum* ha sido identificado en humanos, ratones, bovinos, equinos y muchos otros mamíferos. Por el contrario, *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 también pueden afectar a los humanos, por lo tanto deberían considerarse zoonóticos (Fayer, 2004; Fayer y Xia, 2008).

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

Espece	Hospedero principal	Hospedero secundario	Sitio de infección
<i>C. hominis</i>	Humanos	Dugongo, ovinos	Intestino Delgado

<i>C. parvum</i>	Bovinos, , 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, caprinos	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 solo 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).

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 (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; Santín *et al.*, 2004; Fayer, 2004).

Ciclo biológico:

Cryptosporidium spp. es un parásito monógeno y heterogenético, 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 asexuada y sexuada (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, el ácido clorhídrico, las 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 circumesporozoito (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) (Figura 1 y 2).

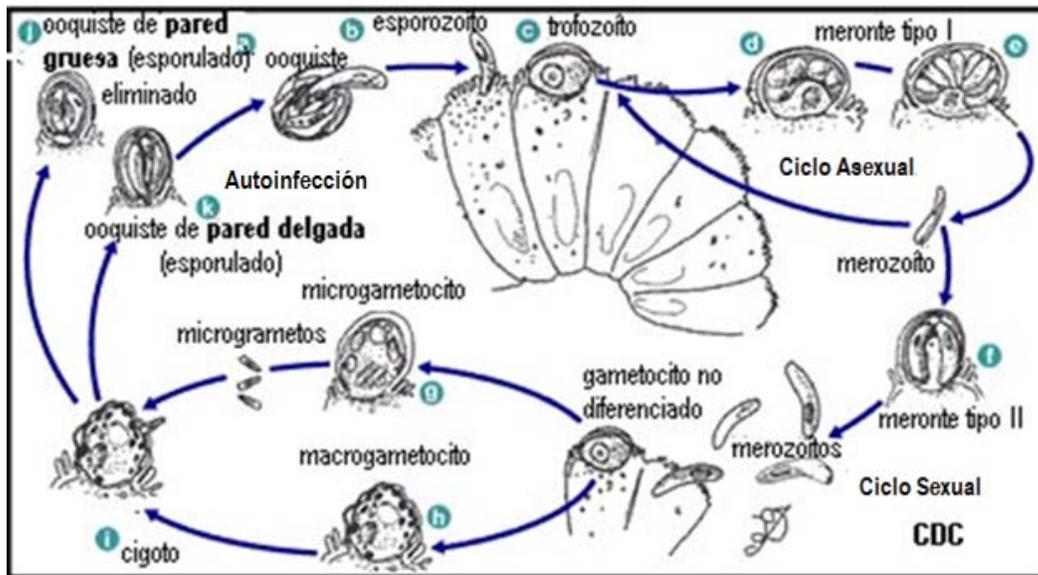


Figura 1. Ciclo biológico del protozoo *Cryptosporidium* spp. (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cryptosporidiosis.htm>)

Figura 2. Esquema de la ubicación intracelular y extracitoplasmática de *Cryptosporidium* spp. PV: vacuola parasitófora, EB: banda electrodensa, FO: organelo alimentador. (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 (figura 3). 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) (figura 4). 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, el cual es el único estado diploide del ciclo y 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 (Garcia y Bruckner, 1988; Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2005; Del Coco *et al.*, 2009).



Figura 3. Observación en microscopía electrónica de barrido del organelo de alimentación expuesto (Fayer y Xiao, 2008).

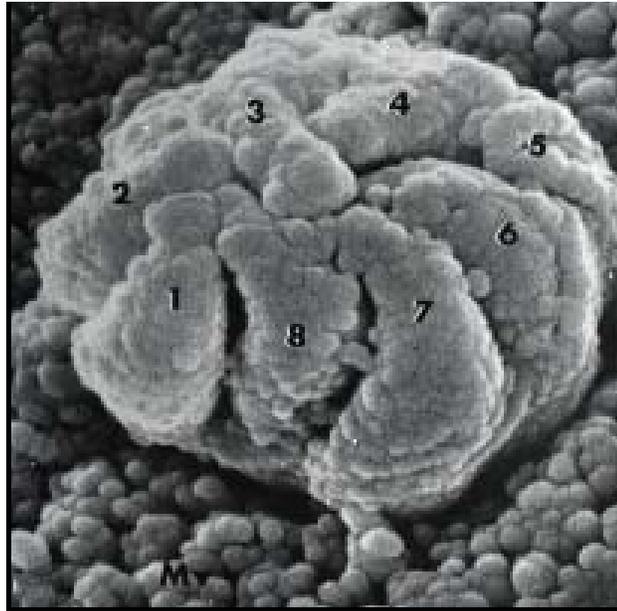


Figura 4. Observación microscópica de un meronte tipo 1 (esquizonte maduro) de *Cryptosporidium* spp. con sus ocho merozoitos (Thompson *et al.*, 2005).

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 presenta 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 período 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).

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 en inmunocomprometidos (Atías, 1998; Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Este parásito se sitúa en el borde luminal de los enterocitos, (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Fayer, 2004; 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 *et al.*, 2007).

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 produce una atrofia parcial de las vellosidades intestinales y 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, reemplazando 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 las pérdidas del tamaño de las vellosidades y del borde microvellositario disminuye la absorción de fluidos, electrolitos y nutrientes, y conduce a la pérdida de enzimas digestivas de membrana, lo cual 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 modificación de las uniones celulares (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Signos clínicos:

No existen signos patognomónicos que diferencien a la criptosporidiosis de procesos patológicos 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 y 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). Así por ejemplo, causa diarrea auolimitada en hospederos inmunocompetentes y diarrea crónica en individuos inmunocomprometidos, como es el caso de pacientes humanos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA) (Del Coco *et al.*, 2009). El síndrome de mala absorción que se produce, además lleva a un sobre crecimiento 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).

Aspectos epidemiológicos:

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 *et al.*, 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 o 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 incrementa las tasas de morbilidad y mortalidad y 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 *et al.*, 2008; Yoder *et al.*, 2010).

Distribución geográfica y prevalencia:

Este protozoo 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 actualmente 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 veterinario como médico 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 que la mayor prevalencia se dio 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 durante el periodo pre-destete, se realiza 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 humanos, 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 Norte América 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 y 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 1980-89, 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 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. 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). 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, U de Chile, en terneros diarreicos, en predios lecheros de la Región Metropolitana, encontró altos niveles de infección, de un 57% (Díaz-Lee *et al.*, 2010), 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 comparando ambos estudios, implica una prevalencia predial de más del doble, utilizando técnicas de diagnóstico similar, la misma especie animal y aproximadamente el mismo grupo etario.

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 estos 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 5) (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 *et al.*, 2008; Yoder *et al.*, 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).

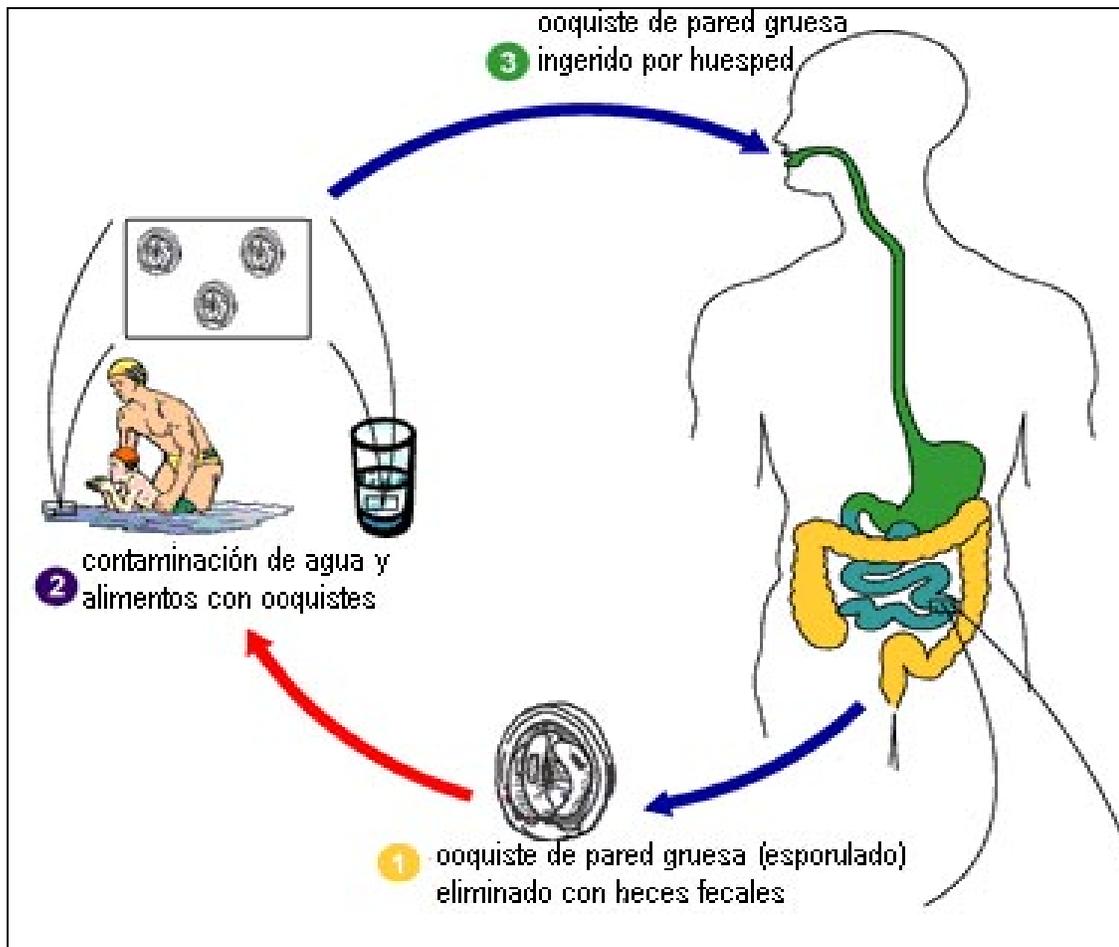


Figura 5. Ciclo biológico del protozoo *Cryptosporidium* spp.
(<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cryptosporidiosis.htm>)

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 se ha detectado que 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).

Brotos 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; 1994; 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., el cual 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 *et al.*, 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 -31,5% en América Central y del Sur (Fayer, 2004; Zanaro *et al.*, 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, 2008; 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, la resistencia

de los ooquistes de este protozoario 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, inmunocompetentes, 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, 2000). Extrapolaciones realizadas a partir del brote ocurrido en Milwaukee, sugieren que la dosis infectante sería posiblemente aún más baja, de 1-10 ooquistes (Okhuysen *et al.*, 1999; Dillingham *et al.*, 2002; Zanaro *et al.*, 2008).

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.

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 *et al.*, 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 *et al.*, 2008; Pintar *et al.*, 2010; Yoder *et al.*, 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 *et al.*, 2010). El tratamiento con el uso combinado de distintos químicos, como el cloro y monoclóramina, así como con ozono y monoclóramina 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 segundos o a 70 °C por 5 segundos) son útiles para eliminar el parásito (Zanaro *et al.*, 2008).

Respecto a la ganadería, los controles para reducir el impacto de la transmisión zoonótica y la contaminación del medio ambiente deberían incluir la adecuada gestión para la eliminación o

disposición de los desechos animales (Zanaro *et al.*, 2008). El control de esta parasitosis en los bovinos es muy difícil, debido a la exposición de los terneros a la contaminación. 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 aplicación de desinfectantes eficaces en las zonas que habitan los animales, la separación de animales enfermos de sanos, la instalación de bebederos y comederos altos para evitar la contaminación de éstos con heces, la remoción diaria del material fecal, el control de la entrada de otros animales posibles portadores (perros, ratas y ratones, etc.), 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 otro lado, 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 *et al.*, 2008; Del Coco, 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 *et al.*, 2008).

Diagnóstico:

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 procedimiento 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).

Detección de ooquistes en heces:

Las distintas técnicas de tinción se realizan sobre extendidos de heces, algunos con el material previamente concentrado con el objeto 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 la examinación microscópica de estos extendidos, previa concentración de la muestra, los que son teñidos ya sea con Giemsa, Heine o 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 (Figura 6) (Georgi y Georgi, 1990; Atías, 1998; Barriga, 2002).

Otra técnica de tinción ácido-resistente para el diagnóstico de este protozoo es la de 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 que permite ver a los estadios parasitarios fluorescentes (Figura 7) (Atías, 1998; Fayer, 2004).

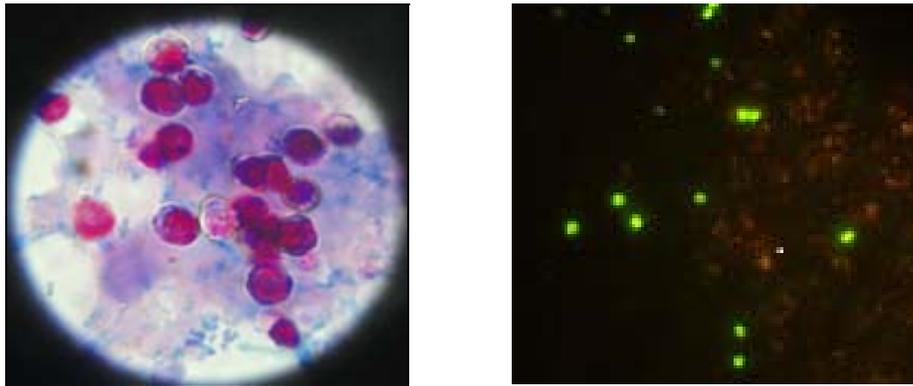


Figura 6-7. Tinción Ziehl Neelsen y Aureamina. Ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, terneros diarreicos, aumento 100x-40x respectivamente. Camara Sony® cyber-shot DSC-H20 zoom 10x. Laboratorio parasitología FAVET Universidad de Chile.

Dentro de las técnicas inmunodiagnósticas se encuentran la aglutinación en látex, la inmunofluorescencia directa (IF) utilizando anticuerpos poli o monoclonales, ELISA de inmunocaptura de antígenos en heces y el diagnóstico inmunocromatográfico (CryptoStrip®) (Garcia 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 una de las técnicas 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 Chile es el de tinción de ZN en extendidos de heces.

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 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 fecales 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 *C. parvum* y *C. hominis* en humanos, es de gran relevancia poder concentrar los ooquistes presentes, de manera eficaz y 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 posean un tamaño de poro que permita retener los ooquistes de *Cryptosporidium*, para

posteriormente procesar las membranas en el laboratorio (Zanaro *et al.*, 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, detección mediante tinción 40,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y detección mediante microscopio de epifluorescencia y la determinación de la morfología interna a través 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 *et al.*, 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 *et al.*, 2004; Zanaro *et al.*, 2008). Una ventaja del uso de las técnicas moleculares es que han provisto información sobre la variabilidad genética de *Cryptosporidium*(Xiao y Fayer, 2008; Zanaro *et al.*, 2008).

Por último, la presente revisión es parte de un proyecto de investigación que se está desarrollando en los laboratorios de los autores del mismo, el que fue financiado por la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, a través de su fondo concursable FIV. Dicho proyecto tiene como objetivo general comparar la sensibilidad analítica de protocolos microscópicos tradicionales y uno molecular en la detección del protozooario zoonótico *Cryptosporidium parvum* en muestras de agua inoculadas con este agente. De esta manera se pretende (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; (3) implementar y estandarizar un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) género- específico que permita la detección e identificación de *Cryptosporidium* presentes en las muestras de aguas contaminadas artificialmente; (4) y para finalizar, determinar y comparar la sensibilidad analítica (límite de detección) de la PCR género-específico, frente a un método de diagnóstico microscópico.

BIBLIOGRAFÍA

- **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]
- **ACHA, P.; SZYFRES, B.** 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 3° edición. 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(S1): S26-S27
- **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(2):120-128.
- **ATÍAS, A.** 1998. Parasitología Médica. Ed. Mediterráneo. 146-151pp.
- **BARRIGA, O.** 2002. Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina. Capítulo 58C. 187-192pp.
- **BOTERO, D.; RESTREPO, M.** 2003. Parasitosis humanas. 4ª ed. Editorial CIB. Medellín, Colombia. 506 p.
- **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(10): 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): 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(1): 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(2): 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. 213-221pp.
- **CORIS BIOCONCEPT.** 2001. *Crypto-Strip (C-1005)*. Testinmunocromatográfico in vitro para detectar oocistos de *Cryptosporidium parvum* em las materias fecales. [Manual de uso]. Belgium, Coris Bioconcept. 4pp.
- **CURRENT, W. L.** 1985. Cryptosporidiosis. *Journal of American Veterinary Medical Association.* 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(3-4): 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(3): 179-185.
- **DEL COCO, V.F.; CÓRDOBA, M.A.; BASUALDO, J.A.** 2009. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Rev Argent Microbiol.* 41: 185-196.
- **DÍAZ-LEE, A.; MERCADO, R.; ONUOHA, E.O.; OZAKI, L.S.; MUÑOZ, P.; MUÑOZ, V.; MARTÍNEZ, F.J.; FREDES, F.** 2010. *Cryptosporidium parvum* in diarrheical calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. *Vet Parasitol.* doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.001

- **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.** 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.** 2008. *In: Cryptosporidium and Cryptosporidiosis.* Fayer and Xiao. Ed CRC Press. Second edition. 560 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): 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(4): 437-438.
- **GARCÍA, L.S.** 1999. *Practical Guide to Diagnostic Parasitology.* ASM Press, Washington, D.C. 349pp.
- **GARCÍA, L.** 2001. *Diagnostic Medical Parasitology.* American Society Microbiology; 4th edition. Washington DC. 1092 pp.
- **GARCIA, L. S; BRUCKNER, D. A.** 1988. *Diagnostic Medical Parasitology.* Capítulo 4. 49-56pp.
- **GEORGI, J. R.; GEORGI, M. E.** 1990. *Parasitology for Veterinarians.* Fifth Edition. 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(1-2): 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(1): 29-34.
- **GUERRANT, R.L.** 1997. Cryptosporidiosis: An Emerging, Highly Infectious Threat. Emerg Infect Dis 3(1):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(10): 6125-6131.
- **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 (4): 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. Applied and Environ Microbiol. 62(2): 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(1-2): 63-65.
- **MADORE, M.S.; ROSE, J.B.; GERBA, C.H.; ARROWOOD, M.J.; STERLING, CH.** 1987. Ocurrance 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.A; OZAKI, L.S.** 2007. *Cryptosporidium hominis* infection of the human respiratory tract. Emerg Infect Dis. 13(3): 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: 995-8.
- **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.
- **PANCIERA, R.J.; THOMASSEN, R.W.; GARNER, F.M.** 1971. Cryptosporidial infeccion in a calf. *Vet Pathol* 8: 479-484 (citado por Fayer y Xiao, 2008).
- **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 (1): 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(2): 103-117.
- **SMITH, H.; NICHOLS, R.** 2009. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. *Exp Parasitol.* 124: 61-79.
- **SOULSBY, E.** 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ª edición. 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(6): 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(9): 3285-3291.
- **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*. Boca Ratón, FL : CRC press: 59-82.
- **URIBARREN, T.** 2010. Criptosporidiosis (o criptosporidiasis). [en línea] <<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/protozoos/cryptosporidiosis.php>> [consulta: 25-07-2010]
- **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]
- **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].

- **ZARLENGA, D.S.; TROUT, J.M. 2004.** Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Vet Parasitol.* 126: 195-217.