UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

DETECCIÓN DE CRYPTOSPORIDIUM EN AGUAS CRUDAS Y TRATADAS DE CONSUMO HUMANO MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES

MUÑOZ YAGUACHE BRIGITTE ELIZABETH
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2019

UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

DETECCIÓN DE CRYPTOSPORIDIUM EN AGUAS CRUDAS Y TRATADAS DE CONSUMO HUMANO MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES

MUÑOZ YAGUACHE BRIGITTE ELIZABETH
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2019

UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EXAMEN COMPLEXIVO

DETECCIÓN DE CRYPTOSPORIDIUM EN AGUAS CRUDAS Y TRATADAS DE CONSUMO HUMANO MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES

MUÑOZ YAGUACHE BRIGITTE ELIZABETH
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

SILVERIO CALDERON CARMEN ELIZABETH

MACHALA, 31 DE ENERO DE 2019

MACHALA
31 de enero de 2019

Nota de aceptación:

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado DETECCIÓN DE CRYPTOSPORIDIUM EN AGUAS CRUDAS Y TRATADAS DE CONSUMO HUMANO MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES, hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.

SILVERIO CALDERON CARMEN ELIZABETH
0702531351
TUTOR - ESPECIALISTA 1

SERAFIN ALVAREZ DIANA HAYDEE
0919075259
ESPECIALISTA 2

LOGROÑO BARRIONUEVO JORGE ISRAEL
1705120192
ESPECIALISTA 3

Fecha de impresión: jueves 31 de enero de 2019 - 11:34

Scanned by CamScanner

URKUND

Urkund Analysis Result

Analysed Document: Detteccción de Cryptosporidium.docx (D47080521)
Submitted: 1/21/2019 5:07:00 PM
Submitted By: bemunoz_est@utmachala.edu.ec
Significance: 0 %

Sources included in the report:

Instances where selected sources appear:

0

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

La que suscribe, MUÑOZ YAGUACHE BRIGITTE ELIZABETH, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado DETECCIÓN DE CRYPTOSPORIDIUM EN AGUAS CRUDAS Y TRATADAS DE CONSUMO HUMANO MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

La autora declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las dispociones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

La autora como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 31 de enero de 2019

MUÑOZ YAGUACHE BRIGITTE ELIZABETH
0706398104

Scanned by CamScanner

RESUMEN

El protozoario Cryptosporidium que afecta frecuentemente a los humanos son los de la especie parvum y hominis, donde los ooquistes de estos parásitos son resistentes a la dosificación de cloro que se establece en las normativas de la Secretaría de Salud en Colombia y las Normas INEN en Ecuador, causando de esta manera enfermedades hídricas como lo es la Criptosporidiosis, enfermedad que prevalece en países industrializados donde oscila entre 0.1 y 27.1%, (EE.UU. Francia, Reino Unido), que por lo general ocurre en parques acuáticos y piscinas de natación públicas mientras que en países en desarrollo los resultados varían entre 0.1 a 31.5% (Colombia, Chile, Brasil), debido al consumo de agua contaminada, se considera importante la identificación del protozoario Cryptosporidium en aguas crudas y tratadas mediante técnicas microbiológicas y moleculares como control de calidad de agua para consumo humano.

En el presente estudio se aplicó el método colorimétrico y cuantitativo con las técnicas de Kinyou y TR-PCR para la detección de Cryptosporidium, tanto en aguas de pozo y potable donde se obtuvieron resultados de agua de pozo: 4/23 (17.39) y en aguas tratadas: 5/38 (13.16%), estos resultados nos brindan una importante información porque reflejan una diferencia entre las aguas de pozo que comúnmente se utilizan en zonas rurales y las aguas de una Planta de tratamiento, comparándolas se concluye que las aguas crudas no son idóneas para el consumo humano.

PALABRAS CLAVE: Agua de pozo, Cryptosporidium, técnica microbiológica, técnica molecular, control de calidad.

ABSTRACT

The Cryptosporidium Protozoan that frequently affects humans are species parvum and hominis, where are the oocysts of these parasites resistant to the chlorine dosage that set out in the regulations of the Ministry of health in Colombia and the INEN standards in Ecuador, causing diseases in this way water how is cryptosporidiosis, disease prevailing in industrialized countries where ranges between 0.1 and 27.1%, (USA France, United Kingdom), which usually occurs in water parks and swimming pools public while in developing countries the results vary between 0.1 to 31.5% (Colombia, Chile, Brazil), due to the consumption of contaminated water, for which the importance of identifying Cryptosporidium in raw and treated waters using microbiological and molecular techniques such as control of water quality for human consumption.

In the present study applied the colorimetric method and quantitative techniques Kinyou and TR-PCR for the detection of Cryptosporidium, in well water and drinking where well water results were obtained: 4/23 (17.39) and treated water: 5/38 (13.16%), These results give us important information because they reflect a difference between the waters of the well that is commonly consumed in rural areas and the waters of a treatment plant by comparing them it is concluded that raw waters are not suitable for human consumption.

KEY WORDS

Water, Cryptosporidium, microbiological technique, molecular technique, control quality well.

ÍNDICE

RESUMEN 1
ABSTRACT 2
1. INTRODUCCIÓN 5
2. OBJETIVOS: 6
2.1. Objetivo General: 6
2.2. Objetivos Específicos: 6
3. DESARROLLO 7
3.1. Cryptosporidium 7
3.1.1. MORFOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN 8
3.1.2. CICLO DE VIDA 9
3.1.3. EPIDEMIOLOGÍA 11
3.2. CONTROL DE CALIDAD DE AGUAS CRUDAS Y TRATADAS 11
3.3. TIPOS DE SUELOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE POZOS DE AGUA 12
3.4. MÉTODO MICROBIOLÓGICO 13
3.4.1. TÉCNICA DE KINYOU 13
3.5. MÉTODOS MOLECULARES 14
3.5.1. TR-PCR 14
3.6. UBICACIÓN GEOGRÁFICA 14
3.7. MATERIALES Y MÉTODOS 14
3.7.1. MÉTODOS: 14
3.7.2. RT-PCR (TaqMan) Y MÉTODO DE FRET 14
3.7.3. Técnica de Kinyou. 15
3.7.4. PROCEDIMIENTO 15
3.8. METODOLOGÍA 16
3.8.1. Área de estudio 16
3.8.2. Muestreo 16
4. RESULTADOS 17
5. CONCLUSIÓN 18
6. RECOMENDACIONES 18
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N.1: Especies de Cryptosporidium frecuentes en humanos…….**8**

Tabla N.-2: Normativa establecida del control microbiológico para el consumo de agua en Colombia y Ecuador…….....**12**

Tabla N.-3: Tasas recomendadas para la infiltración de lixiviados…….**12**

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura N.-1: Ooquistes de Cryptosporidium…….……**7**

Figura N.-2: Ciclo de vida del Cryptosporidium……...……..**10**

Figura N.-3: Inmunofluorecencia de ooquistes de Cryptosporidium……..……**13**

Figura N.-4: Termociclador equipo donde se realizan PCR……**14**

Figura N.-5: Ubicación geográfica de los municipios, ubicados en el departamento de Nariño, suroeste de Colombia……..**17**

1. INTRODUCCIÓN

En muchas partes del mundo, los insectos que viven o se crían en el agua son portadores y transmisores de enfermedades hídricas, algunos de estos insectos, denominados vectores, crecen en el agua limpia[1].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2015 estima que unas 842 000 personas mueren cada año de diarrea como consecuencia de la insalubridad del agua, de un saneamiento insuficiente o de una mala higiene, en el caso de los centros sanitarios los profesionales de salud también se encuentran expuestos a riesgos infecciosos y el 15% de pacientes contraen infecciones mientras se encuentran hospitalizados. Sin embargo, esto puede ser prevenible con ayuda de las autoridades de salud, gubernamentales junto con la comunidad, asumiendo su responsabilidad en este factor de riesgo que implica la muerte de unos 361 000 niños menores de cinco años lo cual se podría prevenir[1,2].

La parasitosis en el agua representa un problema de salud pública a nivel mundial, considerando la importancia del agua como uno de los recursos renovables más importantes para el hombre por su utilidad, de tal manera que es un vehículo importante de agentes patógenos causales de diversas enfermedades en el ser humano, las cuáles afectan frecuentemente a la población en especial a las comunidades rurales que han estado al margen del control de la calidad de las aguas de pozo que generalmente se utilizan para el consumo humano, por lo tanto se concluye que estas aguas aptas para la comunidad[3,4].

2. OBJETIVOS:

2.1.Objetivo General:

- Identificar Cryptosporidium en aguas crudas y tratadas mediante técnicas microbiológicas y moleculares como control de calidad de agua para el consumo humano.

2.2.Objetivos Específicos:

- Aplicar la técnica microbiológica de Kinyou para la detección de Cryptosporidium en aguas crudas y tratadas.
- Comparar la técnica de Kinyou y TR-PCR para la detección de Cryptosporidium en aguas de consumo humano.
- Socializar la importancia del control de calidad de agua para consumo humano.

3. DESARROLLO

3.1.Cryptosporidium

Los ooquistes de Cryptosporidium presentan una pared celular muy dura, lo que les permite sobrevivir fuera del cuerpo durante largos periodos y hace que sean muy resistentes a los desinfectantes físicos como las radiaciones gamma y químicos como el Cloro. Para la erradicación de Cryptosporidium se requiere una concentración mayor de 80 mg/L de cloro en agua, la cual supera la concentración permitida según las Normas INEN en Ecuador es de 0.3mg/L a 1.5mg/L en los parámetros de calidad en cambio en Colombia según La Secretaría de Salud es de 0.3mg/L a 2.0 mg/L de cloro en agua para uso y consumo humano[5,6].

Si bien es cierto la dosificación necesaria de Cloro para erradicar Cryptosporidium es de 80mg/L, este parámetro resulta muy elevado en comparación de los parámetros de concentración de Cloro establecido por las Normas INEN en Ecuador y La Secretaría de Salud en Colombia.

La ingesta de un pequeño número de ooquistes **(Fig.1)** en una mínima cantidad puede provocar una infección (30 ooquistes) de Cryptosporidium[5].

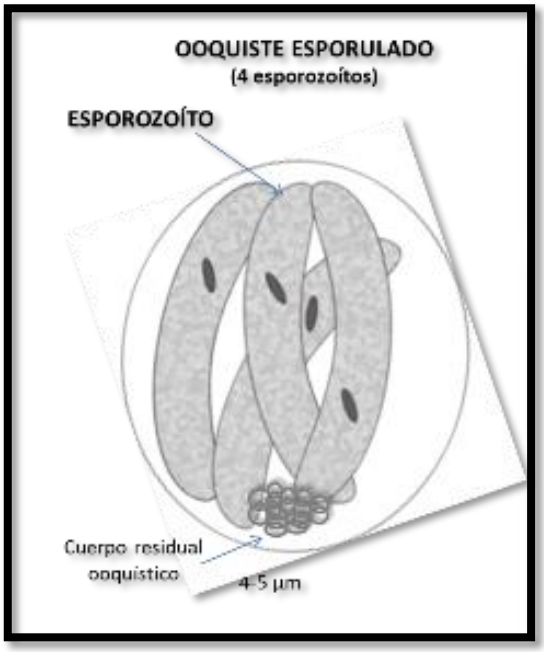

Fig.N.-1: Ooquistes de Cryptosporidium.

3.1.1. MORFOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN

Los parásitos son esféricos o elípticos. En las células epiteliales del intestino presentan un tamaño entre 2 y 6 µm y se encuentran localizados en vacuolas parasitóforas[6]. Los ooquistes presentan cuatro esporozoitos, sin esporocistos, son ovoides y pueden medir entre 4,5 y 7,9 µm. Tienen ocho cromosomas de tamaños moleculares semejantes y presenta uno de los genomas más pequeños de los organismos unicelulares eucarióticos[5].

Existen 20 diferentes especies de Cryptosporidium que causan infecciones moderadas o severas en humanos[7], pero los principales agentes causales son Cryptosporidium hominis y Cryptosporidium parvum[6,7,8], con base en datos morfológicos, biológicos, moleculares[9,10] y se han identificado alrededor de 61 genotipos de especie incierta, con base en la secuencia de ssrRNA[8]. La utilización de herramientas moleculares para el análisis genético, pruebas con TR-PCR y el estudio de los microsatélites han confirmado la autenticidad de especies y la existencia de genotipos dentro de ellas. La taxonomía de este organismo está en rápida evolución; así, por ejemplo, Cryptosporidium pestis, antes el genotipo C. parvum[8,10,11].

La enfermedad en el humano se atribuye con mayor frecuencia a 8 de dichas especies, aunque existen reportes incidentales de infección por otros cyptosporidiums[12,5,13].

Especies de *Cryptosporidium* más frecuentes en el humano	
Cryptosporidium hominis	Humano
C. parvum	Ganado, humano
C. andersoni	Ganado, camellos
C. felis	Gatos
C. canis	Perros
C. suis	Cerdos
C. muris	Roedores
C. meleagridis	Aves
Modificado de: Chalmer RM, Davies AP. Clinical cryptosporidiosis. Ex. Parasitol, Jan 2010.	

Tabla N.1: Especies de Cryptosporidium frecuentes en humanos[42,9].

3.1.2. CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de Cryptosporidium se completa en un mismo hospedador, por lo que es un ciclo directo, que incluye una fase asexual y otra sexual[11,14].

Se inicia con la ingestión del ooquiste por parte del hospedador, ya sea por contacto directo con animales infectados o por la ingestión de agua o alimentos contaminados. Una vez el ooquiste alcanza el intestino, en el íleon, son liberados los 4 esporozoitos que se adhieren a las células epiteliales del intestino y sus microvellosidades[15,16], (Fig.N.-2) estos se diferencian en trofozoítos, comenzando así la reproducción asexual: de trofozoítos, meronte tipo I, a merozoíto, meronte tipo II, merozoíto, gamonte indiferenciado[11]. A continuación, comienza la reproducción sexual, la gametogonia, en la que se generan los microgamontes (masculinos) y los macrogamontes (femeninos). El macrogamonte es fertilizado por los microgamontes, dando lugar al zigoto luego este mismo formará ooquistes esporulados de dos tipos, uno de pared gruesa, que es el que se elimina por las heces y otro de pared fina, que es el que se queda en el organismo, provocando una autoinfección (Fig.N.-2)[14,16,17].

Las dos especies que infectan comúnmente al ser humano son C. hominis y C. parvum[16,18]. Esta última es relevante porque tiene la capacidad de infectar a diferentes hospederos, entre ellos al ganado vacuno. Se sabe que el genoma de este parásito es muy pequeño, pues contiene todo su ADN en sólo ocho cromosomas. Asimismo, carece de muchos de los mecanismos para producir nutrientes necesarios para su ciclo de vida, por lo que el parásito los toma del hospedero mediante un tubo alimentador[6].

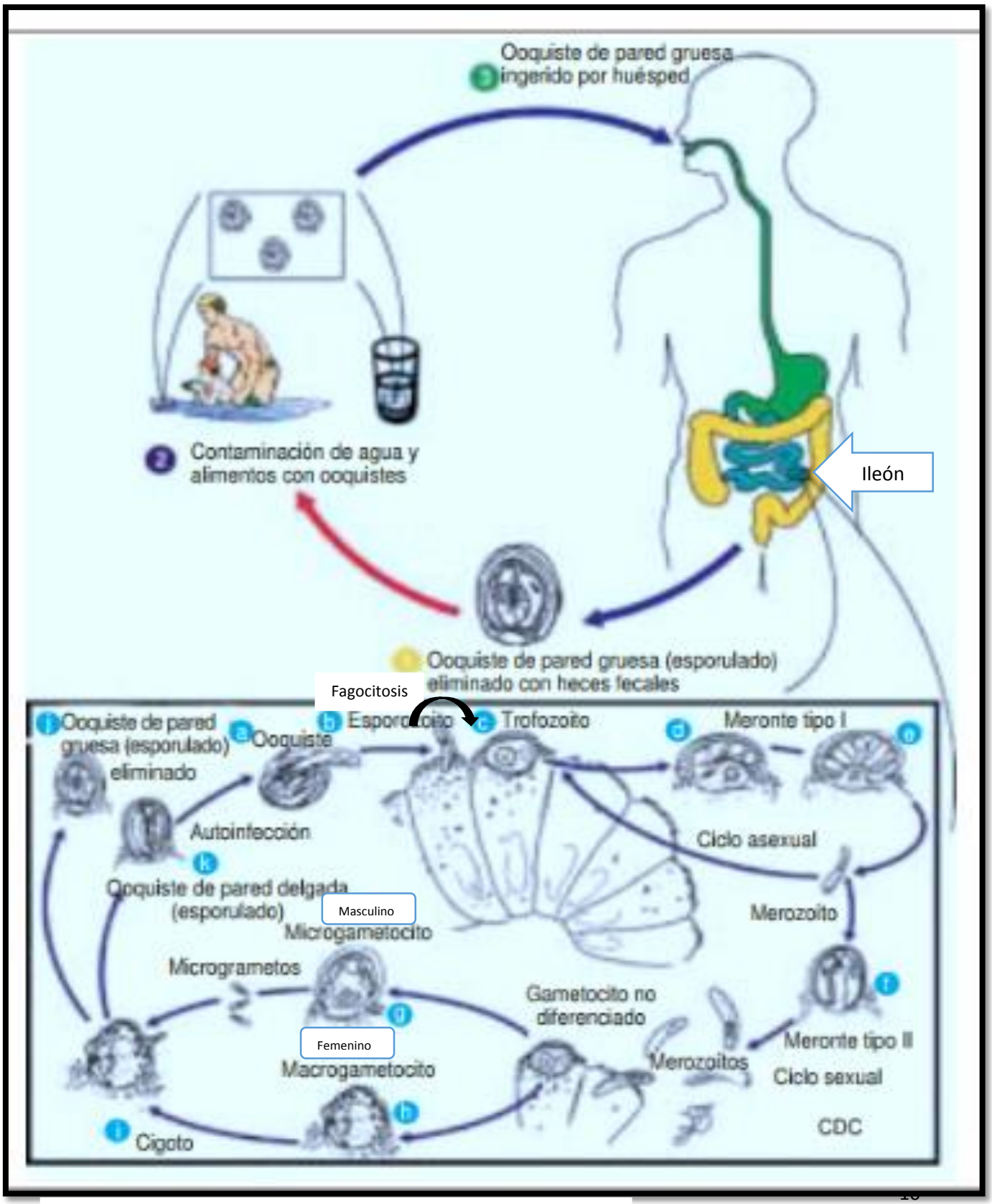

Fig. N.-2: Ciclo de vida del Cryptosporidium[43,6,11].

3.1.3. EPIDEMIOLOGÍA

La Criptosporidiosis es una enfermedad cosmopolita, mayor en zonas con clima tropical o templado, este microorganismo es variable en función de las características socioeconómicas de la población[19], ya que es más frecuente en los lugares con problemas de infraestructura en las canalizaciones de agua potable, en las piscinas, en la eliminación de aguas residuales o con estrecho contacto con animales, sin olvidar factores significativos como la ingesta de agua no potable y las zoonosis[20].

La prevalencia de la enfermedad en países industrializados oscila entre 0.1 y 27.1%, (EE.UU. Francia, Reino Unido) con una media de 4.9%, mientras que en países en desarrollo los resultados varían entre 0.1 a 31.5% (Colombia, Chile, Brasil) con una media de 7.9%[20,21].

En países con mayor desarrollo, la parasitosis se presenta principalmente en la forma de brotes epidémicos debidos a fuentes de agua contaminada, ya sea redes de agua potable, de superficie o recreativas, la mayoría de brotes epidémicos en EE.UU. han ocurrido en parques acuáticos y piscinas de natación públicas[18,22].

La transmisión ocurre por la ingesta de agua contaminada con ooquistes, siendo esta vía indirecta la más significativa[15]. Si bien la filtración es el mejor medio para reducir el número de ooquistes en el agua, los filtros de las plantas potabilizadoras no son suficientes para retenerlos y, además, el tratamiento químico no afecta su viabilidad[23,24].

3.2. CONTROL DE CALIDAD DE AGUAS CRUDAS Y TRATADAS

Se conoce como agua para consumo humano aquella que está libre de patógenos y de sustancias tóxicas que puedan constituir factor de riesgo para el individuo, por lo tanto se establece que las aguas de pozo a las que también se las conoce como aguas crudas, debido a que no llevan un proceso de potabilización, pero aun así son utilizadas para el consumo humano, por lo que ésta también debería cumplir los requerimientos necesarios para que su calidad sea óptima[25,26,27].

REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS			
Colombia 2015		**Ecuador 2014**	
	Máximo		**Máximo**
Coliformes Totales	Ausencia	Coliformes fecales	Ausencia
Cryptosporidium ooquistes/litro	Ausencia	Cryptosporidium, número de ooquistes/ litro	Ausencia
Escherichia coli	Ausencia	Giardia, número de quistes/ litro	Ausencia

Tabla N.-2: Normativa establecida del control microbiológico para el consumo de agua en Colombia y Ecuador[28].

El consumo de aguas que no cumplan con los parámetros establecidos evaluados según las normativas pueden causar brotes de enfermedades hídricas. Por lo tanto, garantizar la calidad del agua en dichos sistemas es prioritario[29,30,31].

3.3. TIPOS DE SUELOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE POZOS DE AGUA

TIPO DE SUELO	TASA DE INFILTRACIÓN (lt/m² - dia)
SUELOS DE BUENA PERMEABILIDAD • Arena • Limos Arenosos, limos • Limos o arcillas porosas	 50 30 20
SUELOS DE BAJA PERMEABILIDAD • Limos o arcillas compactas	10

Tabla N.-3: Tasas recomendadas para la infiltración de lixiviados[32].

3.4. MÉTODO MICROBIOLÓGICO

3.4.1. TÉCNICA DE KINYOU

La tinción de Kinyoun es una variante de la tinción clásica de Ziehl-Neelsen que utiliza como colorante primario Fucsina básica con fenol a concentraciones altas, lo que permite la coloración en frío, mientras que la tinción clásica de Ziehl-Neelsen precisa la utilización de calor en la etapa de la coloración primaria. El resto de las etapas del procedimiento son las mismas que en la metódica original de Ziehl. Como colorante de contraste se utiliza Verde brillante, aunque también puede utilizarse Azul de Metileno[33].

La tinción de Ziehl–Neelsen se utiliza para la diferenciación de los microorganismos ácido-alcohol resistente[33,34]. Estos microorganismos poseen una pared celular lipídica especial, que contiene entre otro ácido micólico, que les permite resistir la decoloración con ácido-alcohol después de la tinción con colorantes básicos como la fucsina y aparecen de color rosa-rojizo, mientras que el resto de los microorganismos se tiñe con el colorante de contraste. Se supone que la permeabilidad a través de las membranas intactas puede ser un componente importante del mecanismo involucrado en el fenómeno de resistencia a la decoloración por alcohol ácido indicado[33,34].

Los microorganismos alcohol-ácido resistentes son básicamente las Mycobacterias, aunque existen otros microorganismos que también presentan esta característica como son el género Nocardia y algunos parásitos como Cryptosporidium[33,34].

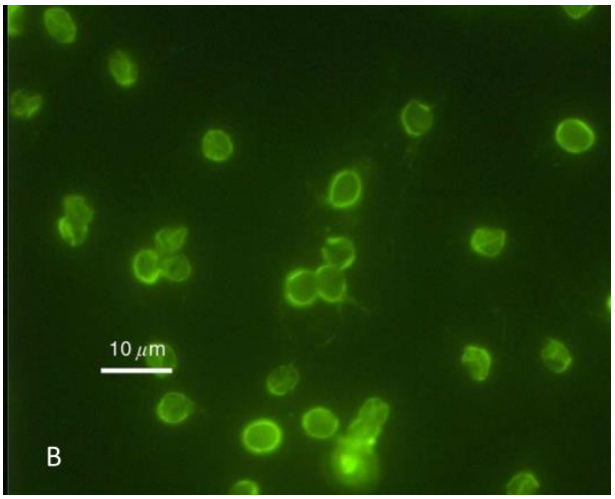

Fig. N.-3: Inmunofluorecencia de ooquistes de Cryptosporidium[27].

3.5. MÉTODOS MOLECULARES

3.5.1. TR-PCR

Como alternativa al diagnóstico convencional se ha desarrollado una gran variedad de protocolos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ácidos nucleicos de Cryptosporidium spp. Los métodos moleculares son los más sensibles para detectar ooquistes en muestras ambientales[35,36.]

Fig. N.-4: Termociclador equipo donde se realizan PCR[37].

3.6. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Según la OMS la distancia mínima en metros que puede existir entre una letrina y un pozo de agua es de 25m y el tipo de suelo adecuado es de limos o arcillas compactas[38].

3.7. MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio: Aguas de pozo

Objeto de estudio: Cryptosporidium

Objetivo de estudio: Control de calidad de las aguas de pozo para consumo humano.

3.7.1. MÉTODOS:

Método colorimétrico cuantitativo

3.7.2. RT-PCR (TaqMan) Y MÉTODO DE FRET

En esta tecnología (de Aplplied Biosystems), la reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador que realiza, a la vez, la detección de fluorocromo mediante luz láser.

En esta tecnología, además de un juego de *primers*, se utiliza una sonda marcada con fluorescencia. La sonda marcada con fluorocromo empleada se diseña de manera que hibrida en algún punto intermedio de la secuencia franqueada por el *primer* sentido y antisentido. Estos *primers* están diseñados para amplificar fragmentos de entre 60 y 150pb. La sonda tiene acoplado un fluorocromo en su extremo 5`, *silenciado* por otro fluorocromo o *quencher* (referencia pasiva). La sonda hibrida en la cadena molde del DNA que será amplificada y libera su fluorocromo sólo cuando la sonda se degrada por la acción de exonucleasa 5`-3`de la DNA polimerasa. Estas sondas se basan en el método FRET, el cual consiste en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia entre moléculas; estas son dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor, y su principio se basa en que una molécula de alta energía cercana a otra de baja energía *(quencher)* promueve una transferencia energética sin emisión de fluorescencia. Una vez que se separan dichas moléculas se emite la fluorescencia, que e s captada por el lector del equipo. Las sondas de este tipo son cortas; para separar las dos moléculas fluorescentes necesitan el rompimiento de su estructura por la DNA polimerasa termoestable (Ampli Taq Gold), que se mantienen inactiva por la unión de un anticuerpo y se libera cuando la reacción se incuba a los 95ºC iniciales de desnaturalización. Los dNTP empleados contienen dUTP en lugar de dTTp, por lo que los productos de PCR contienen dUTP. La mezcla de reacción contiene UNG degradada productos de PCR anteriores. Asimismo, el fluorocromo ROX (conjugado de glicina de 5-carboxi-X-rodamina, succinimidiléster) se incluye como referencia pasiva a una concetracion final de 500nM para normalizar la fluorescencia entre reacciones por cualquier posible fluctuación asociada con variación en el volumen[39,7,16].

3.7.3. Técnica de Kinyou.

Método cualitativo colorimétrico.

Se fundamenta en la capacidad que posee el colorante de teñir los ooquistes de los coccidios intestinales, debido a que estos tienen la propiedad de que su pared quística se encuentre conformada por ácidos grasos, los cuales retienen estos colorantes[40,33,34].

3.7.4. PROCEDIMIENTO

1. Cubrir con Fucsina Fenicada Kinyou. Dejar unos 5 minutos. NO CALENTAR[33]
2. Lavar suavemente con agua corriente. Eliminar el exceso de agua[33].

3. Cubrir con el Decolorante BK, balancear suavemente y a continuación lavar con agua. Si sigue apareciendo coloración rojiza en la muestra repetir la decoloración[33].
4. Lavar suavemente con agua corriente. Eliminar el exceso de agua.
5. Cubrir la preparación con Verde Brillante o Azul de Metileno durante 1 minuto[33].
6. Lavar con agua corriente y secar al aire[33].
7. Examinar al microscopio con objetivo de inmersión[33].

3.8. METODOLOGÍA

3.8.1. Área de estudio

Este estudio se realizó en tres Plantas de Tratamiento de Agua Potable (ETAP), que actualmente suministran agua potable a áreas urbanas y 11 plantas rurales que suministran agua a áreas rurales en el municipio de Pasto situados en el Departamento de Nariño, suroeste de Colombia[41].

3.8.2. Muestreo

En total se recolectaron 110 muestras en ETAP en tres diferentes puntos, de estos se recogieron 72 muestras de agua, 24 muestras de agua cruda de pozo en las entradas a las plantas, 24 muestras después del tratamiento físico-químico; y 24 muestras después de la desinfección con cloro[41].

Las restantes 45 muestras recogidos consistían en sólo agua de pozo, porque en estas plantas no se aplicaban cualquier tipo de tratamiento en los tiempos de muestreo[41].

Las muestras se recogieron en dos ocasiones en 2016, una en Marzo (temporada de lluvias) y la otra en Agosto y Septiembre (temporada seca)[41].

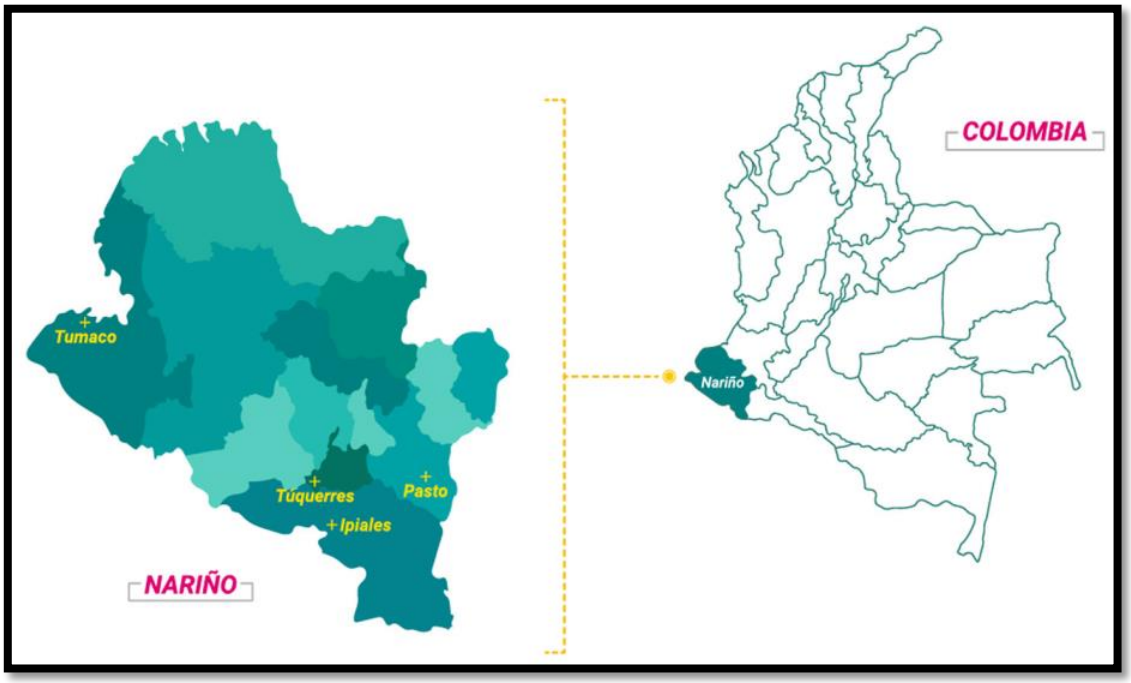

Fig. N.- 5: Ubicación geográfica de los municipios, ubicados en el departamento de Nariño, suroeste de Colombia[41].

4. RESULTADOS

Con la técnica microbiológica de Kinyou se logró detectar de manera cualitativa la presencia del protozoario Cryptosporidium[41].

Se detectó en tiempo real PCR (qPCR) con detección de punto final, utilizando *primers* y las sondas TaqMan para así identificar las especies de Cryptosporidium, se usó un marcador de ARNr de subunidad pequeña (SSU), utilizando el *primer* SSUrRNAF y SSUrRNAR, y subtipos de C. parvum basándose en el análisis de secuencia de gp60[41].

El Cryptosporidium se encontró con mayor frecuencia en las plantas de tratamiento que abastecen a las zonas rurales encontrado tanto en muestras de agua cruda como tratada de ETAP (agua cruda: 4/23, 17.39%) y en aguas tratadas (5/38, 13.16%)[41].

5. CONCLUSIÓN

En base a la revisión bibliográfica de las Normativas microbiológicas y detección molecular para Colombia y Ecuador se determinó la presencia de Cryptosporidium en muestras de agua de pozo y tratadas de El Departamento de Nariño[41].

El contagio de Cryptosporidium se produjo con mayor incidencia en aguas de pozo (crudas) con relación de las aguas tratadas[41].

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda a las autoridades nacionales de ambos países implementar un programa de control de calidad de aguas de pozo para el consumo humano enfocado a las zonas rurales tanto de Colombia como en Ecuador.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) li. Guías Para La Calidad Del Agua Potable SEGUNDA EDICIÓN Volumen 3 Viligancia y Control de Los Abastecimientos de Agua a La Comunidad.

(2) OMS. Manual Para El Desarrollo de Planes de Seguridad Del Agua. *Water* **2009**, 116.

(3) Guillen, A.; González, M.; Gallego, L.; Suárez, B.; Heredia, H. L.; Hernández, T.; Naranjo, M.; Salazar, J. Presencia de Protozoarios Intestinales En Agua de Consumo En La Comunidad 18 de Mayo. Estado Aragua-Venezuela, 2011. *Bol. Malariol. y Salud Ambient.* **2013**, *53* (1), 29–36.

(4) Balderrama-Carmona, A. P.; Gortáres-Moroyoqui, P.; Álvarez-Valencia, L. H.; Castro-Espinoza, L.; Balderas-Cortés, J. D. J.; Mondaca-Fernández, I.; Chaidez-Quiroz, C.; Meza-Montenegro, M. M. Quantitative Microbial Risk Assessment of Cryptosporidium and Giardia in Well Water from a Native Community of Mexico. *Int. J. Environ. Health Res.* **2015**, *25* (5), 570–582. https://doi.org/10.1080/09603123.2014.989492.

(5) Rodriguez, J. C.; Royo, G. Cryptosporidium y Criptosporidiosis. *Control Calid. SEIMC* **2001**, 1–7.

(6) Fayer, R. Taxonomy and Species Delimitation in Cryptosporidium. *Exp. Parasitol.* **2010**, *124* (1), 90–97. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.005.

(7) Itoh, N.; Oohashi, Y.; Ichikawa-Seki, M.; Itagaki, T.; Ito, Y.; Saeki, H.; Kanai, K.; Chikazawa, S.; Hori, Y.; Hoshi, F.; et al. Molecular Detection and Characterization of Cryptosporidium Species in Household Dogs, Pet Shop Puppies, and Dogs Kept in a School of Veterinary Nursing in Japan. *Vet. Parasitol.* **2014**, *200* (3–4), 284–288. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.030.

(8) Siddiki, A. Z.; Mina, S. A.; Farzana, Z.; Ayesa, B.; Das, R.; Hossain, M. A. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2015**, *5* (3), 202–207. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30007-1.

(9) Cama, V. A.; Mathison, B. A. Infections by Intestinal Coccidia and Giardia Duodenalis. *Clin. Lab. Med.* **2015**, *35* (2), 423–444. https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.010.

(10) Checkley, W.; White, A. C.; Jaganath, D.; Arrowood, M. J.; Chalmers, R. M.; Chen, X. M.; Fayer, R.; Griffiths, J. K.; Guerrant, R. L.; Hedstrom, L.; et al. A Review of the Global Burden, Novel Diagnostics, Therapeutics, and Vaccine Targets for Cryptosporidium. *Lancet Infect. Dis.* **2015**, *15* (1), 85–94. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70772-8.

(11) Borowski, H.; Thompson, R. C. A.; Armstrong, T.; Clode, P. L. Morphological Characterization of Cryptosporidium Parvum Life-Cycle Stages in an in Vitro Model System. *Parasitology* **2010**, *137* (1), 13–26. https://doi.org/10.1017/S0031182009990837.

(12) Hedstrom, L. Cryptosporidium: A First Step toward Tractability. *Trends Parasitol.* **2015**, *31* (9), 401–402. https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.08.003.

(13) Wu, X.; Song, L.; Liang, J.; Luo, S.; Mehlhorn, H.; Wu, Z. Together in the Fight against Neglected Public Health Problems: Worldwide Network Cooperation on

Waterborne Diseases and Emerging Parasitic Diseases. *Parasitol. Res.* **2015**, *114* (5), 1989–1991. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4395-1.

(14) Clode, P. L.; Koh, W. H.; Thompson, R. C. A. Life without a Host Cell: What Is Cryptosporidium? *Trends Parasitol.* **2015**, *31* (12), 614–624. https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.08.005.

(15) Dillingham, R. A.; Lima, A. A.; Guerrant, R. L. Cryptosporidiosis: Epidemiology and Impact. *Microbes Infect.* **2002**, *4* (10), 1059–1066. https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01630-1.

(16) de Souza, M. S.; O'Brien, C.; Santin, M.; Jenkins, M. A Highly Sensitive Method for Detecting Cryptosporidium Parvum Oocysts Recovered from Source and Finished Water Using RT-PCR Directed to Cryspovirus RNA. *J. Microbiol. Methods* **2018**, *156* (November 2018), 77–80. https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2018.11.022.

(17) Ramo, A.; Quílez, J.; Vergara-Castiblanco, C.; Monteagudo, L.; Del Cacho, E.; Clavel, A. Multilocus Typing and Population Structure of Cryptosporidium from Children in Zaragoza, Spain. *Infect. Genet. Evol.* **2015**, *31*, 190–197. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.01.023.

(18) Khan, A.; Shaik, J. S.; Grigg, M. E. Genomics and Molecular Epidemiology of Cryptosporidium Species. *Acta Trop.* **2018**, *184*, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.023.

(19) Anders, K. L.; Thompson, C. N.; Thuy, N. T. Van; Nguyet, N. M.; Tu, L. T. P.; Dung, T. T. N.; Phat, V. V.; Van, N. T. H.; Hieu, N. T.; Tham, N. T. H.; et al. The Epidemiology and Aetiology of Diarrhoeal Disease in Infancy in Southern Vietnam: A Birth Cohort Study. *Int. J. Infect. Dis.* **2015**, *35*, e3–e10. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.03.013.

(20) Thompson, R. C. A.; Ash, A. Molecular Epidemiology of Giardia and Cryptosporidium Infections. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *40*, 315–323. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.028.

(21) Gonzalez, M. D.; McElvania, E. New Developments in Rapid Diagnostic Testing for Children. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2018**, *32* (1), 19–34. https://doi.org/10.1016/j.idc.2017.11.006.

(22) Blanco Díaz, M. A.; Reyes Romagosa, D. E. Análisis Estadístico de La Enfermedad Diarreica Aguda En Pacientes Atendidos En Servicio de Urgencias Durante El 2012-2013. *Rev. Cuba. Investig. Biomed.* **2015**, *34* (2), 104–111. https://doi.org/10.16373/j.cnki.ahr.150049.

(23) Poynton, T. A.; Lapan, R. T. Aspirations, Achievement, and School Counselors' Impact on the College Transition. *J. Couns. Dev.* **2017**, *95* (4), 369–377. https://doi.org/10.1002/jcad.12152.

(24) Garro, C. J.; Morici, G. E.; Utgés, M. E.; Tomazic, M. L.; Schnittger, L. Prevalence and Risk Factors for Shedding of Cryptosporidium Spp. Oocysts in Dairy Calves of Buenos Aires Province, Argentina. *Parasite Epidemiol. Control* **2016**, *1* (2), 36–41. https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.03.008.

(25) Baque, R.; Simba, L.; Gonzalez, B.; Suatunce, P.; Diaz, E.; Cadme, L. Calidad Del

Agua Destinada Al Consumo Humano En Un Cantón de Ecuador / Quality of Water Intended for Human Consumption in a Canton of Ecuador. *Cienc. Unemi* **2016**, *9* (20), 109–117. https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016pp109-117p.

(26) Bracho-Fernández, Irguin A.; Fernández-Rodríguez, M. Evaluación de La Calidad de Las Aguas Para Consumo Humano En La Comunidad Venezolana de San Valentín, Maracaibo. *Minería y Geol.* **2017**, *33* (3), 341–352.

(27) Balderrama-Carmona, A. P.; Gortáres-Moroyoqui, P.; Álvarez, L. H.; Ulloa-Mercado, R. G.; Leyva-Soto, L. A.; Díaz-Tenorio, L. M. Perspectives of Quantitative Risk Assessment Studies for Giardia and Cryptosporidium in Water Samples. *Water. Air. Soil Pollut.* **2017**, *228* (5). https://doi.org/10.1007/s11270-017-3333-5.

(28) INEN. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Agua Potable. Requisitos. **2014**, No. 5, 1–10.

(29) Merchán, M. A.; Caicedo, M. I. T.; Torres, A. K. D. Molecular Biology Techniques for Research Development. A Literature Review | Técnicas de Biología Molecular En El Desarrollo de La Investigación. Revisión de La Literatura. *Rev. Habanera Ciencias Medicas* **2017**, *16* (5), 796–807.

(30) Cercado Mancero, A. G.; Mancero, A. G. C. Factores Predisponentes y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias Intestinales Incidencia En El Desarrollo Pondo-Estatural En Niños/as, Sector Urbano Marginal "LAS PALMAS" Milagro–Ecuador. *Cienc. Unemi* **2015**, *6* (10), 9. https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol6iss10.2013pp9-18p.

(31) Miraftab, V.; Mansour, R. R.; Yu, M. Moment Method Using Fuzzy Basis Functions. *IEEE MTT-S Int. Microw. Symp. Dig.* **2007**, *35*, 1999–2002. https://doi.org/10.1109/MWSYM.2007.380241.

(32) Administración, L. A.; De Acueductos, N.; Alcantarillados, Y. Norma Tecnica Para La Perforación De Pozos Profundos En.

(33) Cromakit. Bk Kinyoun Kit. *Química Clin. Apl.* **2016**, *34* (977), 1.

(34) Elsafi, S. H.; Al-Sheban, S. S.; Al-Jubran, K. M.; Abu Hassan, M. M.; Al Zahrani, E. M. Comparison of Kinyoun's Acid-Fast and Immunofluorescent Methods Detected an Unprecedented Occurrence of Cryptosporidium in the Eastern Region of Saudi Arabia. *J. Taibah Univ. Med. Sci.* **2014**, *9* (4), 263–267. https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2014.03.008.

(35) Silva-Díaz, H.; Campos-Flores, H.; Llagas-Linares, J. P.; Llatas-Cancino, D. Intestinal Coccidiosis in Children Admitted to a Hospital in Peru and Comparison of Two Methods for Detecting Cryptosporidium Spp. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **2016**, *33* (4), 739–744. https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.334.2560.

(36) Ahmed, S. A.; Karanis, P. An Overview of Methods / Techniques for the Detection of Cryptosporidium in Food Samples. **2018**.

(37) Swift, E. Termociclador. **2004**.

(38) Castellanos, J. Biomédica Instituto Nacional de Salud. *Biomedica* **2016**, *36* (1), 5–9.

(39) Bolivar, A. M.; Rojas, A.; Garcia-lugo, P. Dialnet-PCRYPCRMultiple-4796903. **2014**, *3* (1), 25–33.

(40) Arnedo, I.; Bracho, M.; Díaz-Suárez, O.; Botero, L. Kasmera. *Kasmera* **2008**, *36* (2), 120–128. https://doi.org/0075-5222.

(41) Sánchez, C.; López, M. C.; Galeano, L. A.; Qvarnstrom, Y.; Houghton, K.; Ramírez, J. D. Molecular Detection and Genotyping of Pathogenic Protozoan Parasites in Raw and Treated Water Samples from Southwest Colombia. *Parasites and Vectors* **2018**, *11* (1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s13071-018-3147-3.

(42) Chalmers, R. M.; Davies, A. P. Minireview: Clinical Cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol.* **2010**, *124* (1), 138–146. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.003.

(43) DOMÉNECH, J. Cryptosporidium y Giardia, Problemas Emergentes En El Agua de Consumo Humano. *Offarm* **2013**, *22*, 5.