

## BROTOS EPIDÉMICOS DE CRIPTOSPORIDIOSIS

**Ana María García Tapia, Clotilde Fernández Gutiérrez del Álamo, Carmen López García, Pedro García Martos, Pilar Marín Casanova**

**Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz**

La criptosporidiosis constituye uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo, hasta el punto de ser considerada en la actualidad como una enfermedad emergente. Se trata de una zoonosis de transmisión fecal-oral producida tras la ingestión de ooquistes de *Cryptosporidium* excretados en las heces de animales o humanos. Aunque la infección puede ocurrir de forma esporádica, son cada vez más frecuentes los brotes epidémicos, generalmente de transmisión hídrica, asociados a aguas de bebida contaminadas, pozos, aguas superficiales y de la red de abastecimiento público, incluso filtradas y tratadas. La resistencia del protozoo a la cloración ha provocado la aparición de epidemias en muchos países industrializados, algunas de ellas de gran magnitud con afectación de miles de personas. Desde 1982 el número de casos se ha incrementado espectacularmente debido a la epidemia del sida.

En los últimos años se han incorporado nuevas técnicas para el diagnóstico de la criptosporidiosis, identificación de la especie y genotipado. Se dispone de muchas dianas para la caracterización genética y de procedimientos muy sensibles para la detección de los ooquistes, incluso para identificar aquellos con capacidad infectiva para el hombre. Es prioritario intensificar el uso de estas técnicas, tanto para mejorar el diagnóstico clínico, sobre todo durante los brotes diarreicos, como para identificar el origen de la contaminación, informar de su importancia para la salud pública y entender mejor la epidemiología de la criptosporidiosis.

Los recientes avances metodológicos están favoreciendo el control de los brotes y han venido a demostrar el riesgo de transmisión hídrica de la enfermedad. Es necesario potenciar la vigilancia de este patógeno impulsando tanto su declaración a través del Sistema de Información Microbiológica como su búsqueda en brotes de etiología desconocida compatibles con criptosporidiosis. Así mismo, se debería reforzar la coordinación con los responsables de Sanidad Ambiental para incidir en la vigilancia de *Cryptosporidium* en redes de abastecimiento de agua y en piscinas.

### **CARACTERÍSTICAS Y CICLO BIOLÓGICO DE *Cryptosporidium***

La primera descripción de *Cryptosporidium parvum* la realizó Tyzzer en 1910, aunque hasta 1976 no se relacionó con enfermedad en el hombre. Desde entonces, y especialmente en las dos últimas décadas, se le ha implicado como agente productor de brotes transmitidos por el agua o los alimentos con manifestaciones gastrointestinales tanto en inmunocompetentes como en inmunodeprimidos. La infección se caracteriza por una diarrea típicamente acuosa cuya duración es de días a semanas. En pacientes inmunocompetentes la enfermedad es autolimitada mientras que en inmunodeprimidos la infección se cronifica y puede resultar fatal.

*Cryptosporidium* es un coccidio entérico, parásito intracelular taxonómicamente incluido en el Phylum *Apicomplexa*, clase *Coccidia* y familia *Cryptosporidiidae*. Las técnicas moleculares han permitido identificar 13 especies diferentes, que se relacionan en la tabla 1.

**Tabla 1. Especies descritas y hospedadores habituales.**

<b>Especie</b>	<b>Detección en:</b>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Rumiantes y humanos
<i>C. hominis</i>	Humanos
<i>C. muris</i>	Roedores, otros mamíferos
<i>C. andersoni</i>	Ganado vacuno
<i>C. wrairi</i>	Cobayas
<i>C. felis</i>	Gatos
<i>C. canis</i>	Perros
<i>C. meleagridis</i>	Pavos, aves y humanos
<i>C. baileyi</i>	Pollos y pájaros
<i>C. galli</i>	Pájaros
<i>C. serpentis</i>	Lagartos, serpientes
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos, serpientes
<i>C. molnari</i>	Peces

El género *Cryptosporidium* se diferencia de otros coccidios en que su ciclo vital se desarrolla dentro de la célula, pero en una vacuola extracitoplasmática. La infección se produce por la ingestión de esporoquistes que contienen en su interior cuatro esporozoítos, que se liberan en el intestino y penetran en los enterocitos donde se producen sucesivamente la esquizogonia, gametogonia y esporogonia y dan lugar a los ooquistes que son eliminados a la luz intestinal. El 20% de ellos carecen de la doble pared que los hace resistentes a las condiciones ambientales y liberan los esporozoítos en la luz intestinal produciendo una reinfección endógena. Este mecanismo de autoinfección es muy importante clínicamente ya que explica cómo un pequeño inóculo puede llegar a producir una infección persistente, muy grave, en inmunodeprimidos. El que la esporogonia suceda dentro de los enterocitos es la razón por la que los ooquistes de *C. parvum* son ya infecciosos cuando son expulsados en las heces. En el medio ambiente se mantienen infecciosos durante meses en un intervalo amplio de temperaturas.

## EPIDEMIOLOGÍA DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS

La infección puede transmitirse de animal a persona, de persona a persona, a través del agua y los alimentos contaminados con material fecal, o por contacto con superficies medioambientales contaminadas. La transmisión animal ha sido claramente documentada con los dos genotipos predominantes de *C. parvum*, 1 y 2.

Los grandes brotes se han asociado fundamentalmente al agua, ya sea aguas de bebida (de grifo, lagos, arroyos) o por contacto con aguas de recreo. Se han demostrado pocos brotes por ingesta de alimentos y sólo un brote en Maine, EEUU, fue definitivamente asociado con zumo fresco de manzana. En otros brotes alimenticios se ha implicado a los manipuladores de éstos. En contraste con los escasos datos epidemiológicos que implican a los animales domésticos como fuente de criptosporidiosis en humanos, la transmisión de *C. parvum* desde becerros es inequívoca; se estima que el 50% de los becerros de las vaquerías excretan ooquistes y que el parásito está presente en más del 90% de los establos. La alta prevalencia de animales infectados aconseja prudencia en la ingesta de leche no pasteurizada, incluso en población sana.

*Cryptosporidium hominis* afecta únicamente al hombre y ha sido responsable de muchos brotes en todo el mundo, mientras que *C. parvum*, que parece ser el principal implicado en Europa, es capaz de infectar también a todas las especies de mamíferos, especialmente a animales recién nacidos; el genotipo 1 es el que más se aísla en humanos

en la mayoría de los estudios y se asocia a una mayor intensidad y duración de la parasitosis. Otras especies de *Cryptosporidium* no se consideraban hasta hace poco patógenas para el hombre. Sin embargo, en los últimos años, se han descrito más de 40 casos de infección por *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. muris* y *C. baileyi*, todos ellos en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Las enfermedades transmitidas a través del agua, como la criptosporidiosis, están influenciadas por factores biológicos, medioambientales y comunitarios. La elevada incidencia de la infección en la población y en los animales, el alto porcentaje de excreción de quistes y la estabilidad e infectividad de los mismos [dosis infectiva del 50% (ID<sub>50</sub>): 10-1042 ooquistes] son los factores biológicos que contribuyen a la alta concentración de parásitos en las aguas medioambientales y a la diseminación de la enfermedad. La procedencia del agua es uno de los factores medioambientales clave; así, por ejemplo, las aguas residuales y las que reciben excrementos de ganado tienen una concentración diez a cien veces mayor de ooquistes. En las muestras examinadas de aguas superficiales se han encontrado ooquistes en un porcentaje entre el 4% y el 100%, con unos niveles entre 0,1 y 10<sup>4</sup> ooquistes/100 l, dependiendo del impacto de aguas residuales y de animales. Las aguas de bebida de origen superficial son más susceptibles de contaminación que las profundas.

Los factores climáticos que se asocian a elevadas concentraciones de ooquistes en el agua son la temperatura (incrementan su supervivencia las bajas temperaturas) y los aguaceros. El tipo de clima ha sido considerado, hipotéticamente, como un factor mayor en la transmisión de la criptosporidiosis. Se ha descrito relación entre el incremento de lluvias torrenciales y la elevación de la concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* y *Giardia* en aguas de ríos.

Finalmente, entre los factores comunitarios, se incluyen los sistemas de distribución de las aguas de bebida y de recreo, que condicionan la probabilidad de que los ooquistes se diseminen en el medio ambiente. Del tipo de tratamiento del agua potable (filtración y desinfección) y de la precisión del mismo dependerá el impacto del patógeno en el agua. Brotes transmitidos por el agua se han descrito por todo el mundo. En general, puede decirse que las lluvias torrenciales son una importante variable en los brotes por aguas de bebida y los accidentes fecales en los brotes por aguas de recreo.

Las aguas de bebida responsables de estos brotes incluyen aguas superficiales (lagos, ríos, arroyos), pozos y manantiales. Sin embargo, sucede que aunque en la mayoría de los países ocurren brotes, muy pocos han sido identificados como causados por *Cryptosporidium*. El mayor brote documentado es el de Milwaukee, EEUU, en 1993; la combinación de una primavera muy lluviosa y el deshielo, con fallos en los procesos de floculación y filtración en una planta de tratamiento de aguas llevaron a la contaminación del lago Michigan, provocando 403.000 casos aproximadamente y 67 muertes. La concentración de ooquistes estimada fue de 6,7 a 13,2/100 L (se estudió a partir de los cubitos de hielo preparados con esa agua). Asociados a aguas de bebida se han descrito otros brotes en EEUU, Canadá, Japón y Brasil; en la India, Sudáfrica y Méjico también se han demostrado brotes asociados significativamente a lluvias estacionales. En Europa se han documentado en los últimos años más de 20 brotes, la mayoría en Inglaterra y Gales y asociados a lluvias torrenciales. Se han demostrado elevados niveles de contaminación por *Cryptosporidium* y *Giardia* en estudios realizados sobre aguas de bebida en Holanda, Canadá y Australia, en diversos lugares de Asia como Taiwan (el 40% de las muestras de agua potable) y Japón (del 37 al 100% de las muestras, dependiendo del área).

Otros brotes importantes se han relacionado con piscinas y parques acuáticos. En efecto, las aguas recreativas son frecuentemente origen de brotes, principalmente piscinas

contaminadas accidentalmente por heces, pero también aguas de lagos probablemente contaminados de forma accidental por aguas fecales. De todo esto se deduce la importancia de controlar la presencia de quistes de *Cryptosporidium* en este tipo de agua.

## MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El periodo de incubación de la criptosporidiosis suele ser de 7 a 10 días desde la ingestión de los quistes. En los inmunocompetentes el proceso es autolimitado, de una semana de duración; excepcionalmente, puede prolongarse varias semanas y los síntomas más frecuentes son náuseas, fiebre, dolor abdominal y diarrea de 2-10 deposiciones diarias. Las heces contienen principalmente agua y moco y poca materia fecal, pero muy raramente sangre o leucocitos. Algunos pacientes sólo presentan síntomas leves, mientras que otros requieren rehidratación oral o parenteral y la diarrea persiste por encima de las cuatro semanas; esto ocurre especialmente en ancianos y en niños. También se ha relacionado la infección por este parásito con infecciones pulmonares, sinusitis y laringotraqueítis y con la enfermedad respiratoria que a menudo acompaña a la diarrea en niños malnutridos, así como con trastornos del crecimiento en las infecciones crónicas.

En los inmunodeprimidos, la duración y gravedad de la enfermedad diarreica depende del estado inmune del paciente. La infección puede ser asintomática o manifestarse como diarrea aguda, intermitente o crónica, conduciendo incluso a la muerte en pacientes inmunodeprimidos graves. Los linfocitos CD4+ son mediadores inmunológicos importantes en el control de la infección, y se ha demostrado experimentalmente la asociación entre el déficit de estos linfocitos T y la persistencia de la infección. Así, en enfermos de sida, produce una infección crónica con la sintomatología ya descrita, pero acompañada de malabsorción y deshidratación grave, con 5-20 deposiciones diarias y a veces pérdida de hasta 20 litros al día. En ocasiones, la diarrea coleriforme se prolonga durante semanas o meses, provocando pérdidas de peso de hasta el 50%. La persistencia de la diarrea por *Cryptosporidium* durante más de 30 días en los pacientes infectados por el VIH es un criterio diagnóstico de sida. En estos pacientes, *Cryptosporidium* puede producir infecciones extraintestinales como las que afectan a la vía biliar (dilatación biliar intrahepática o extrahepática y colangitis esclerosante asociada al sida en enfermos con menos de 50 CD4). El mecanismo patogénico por el que parasita la vía biliar no es bien conocido. El reservorio biliar contribuye a la cronicidad de la infección y a la incapacidad de erradicar el microorganismo. En estos pacientes puede también producir hepatitis o pancreatitis aguda y afectación respiratoria (laringotraqueítis, sinusitis, tos o disnea del esfuerzo).

## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de laboratorio de la criptosporidiosis requiere la obtención correcta de las heces, siendo necesarias, generalmente, un mínimo de tres muestras para descartar la infección. Conviene recordar que el número de quistes suele estar relacionado con la consistencia de las heces: a más diarrea más ooquistes. En caso de diarrea acuosa es conveniente recoger las partes mucosas, que son especialmente ricas en quistes. También pueden investigarse los quistes en biopsias gastrointestinales, en bilis o en muestras respiratorias. En los enfermos infectados por el VIH con diarrea, debe investigarse sistemáticamente la presencia de *Cryptosporidium*. Puesto que los ooquistes eliminados en las muestras son infecciosos, se recomienda el uso de un fijador como el SAF (acetato de sodio, ácido acético, formol) o el PVA (alcohol polivinílico), aunque este último puede interferir en el método de concentración formol-éter y en ciertas tinciones. Para el resto de las muestras (biopsias, secreciones respiratorias y bilis), se aconseja una solución salina formolada al 5 ó 10%.

Aunque el diagnóstico de la criptosporidiosis puede realizarse tras la observación microscópica directa en fresco de las heces, generalmente es necesario el uso de técnicas de concentración. El centrifugado a 500 x *g* durante al menos 10 min es fundamental para la recuperación de los quistes. A partir del sedimento realizaremos el examen microscópico en fresco con lugol, y tinciones [auramina, Kinyoun o inmunofluorescencia (IF)]. La tinción de auramina solamente se aconseja como cribado y deberá confirmarse posteriormente mediante ácido-resistencia o IF.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* son esféricos, miden entre 4-6  $\mu\text{m}$ , contienen cuatro esporozoitos y en la observación en fresco con lugol permanecen incoloros, característica que los diferencia de las levaduras. Las tinciones ácido-resistentes son las de referencia para la identificación de los ooquistes, empleando como decolorante ácido sulfúrico o clorhídrico durante breves segundos. Es importante tener en cuenta que en las tinciones ácido-resistentes los ooquistes pueden confundirse con ciertos artefactos, de diferentes tamaños y teñidos intensamente de rojo de manera uniforme, que aparecen en ocasiones. Es también importante señalar que sólo un pequeño porcentaje de los ooquistes excretados presenta ácido-resistencia. Los verdaderos ooquistes de *Cryptosporidium* toman la tinción irregularmente, de forma que al microscopio se observan quistes teñidos de rojo, otros de rosa y el resto sin teñir (formas "fantasma"). Estudios cuantitativos realizados en España han demostrado que el porcentaje de quistes teñidos aumenta considerablemente con un tratamiento previo de las heces durante 10 min con agua oxigenada (concentración final de 5 volúmenes) o bien si dejamos transcurrir un tiempo entre la excreción de las heces y la realización de las tinciones.

Las técnicas de detección de *Cryptosporidium* mediante inmunoensayos son más sensibles y específicas que la microscopía. Las técnicas de IF alcanzan hasta un 100% de sensibilidad y de especificidad y el límite de detección son 10.000 ooquistes/g de heces diarreas o 50.000/g de heces consistentes. Las de enzimoanálisis, EIA, alcanzan del 66,3 al 100% de sensibilidad y del 93 al 100% de especificidad. Algunas de estas técnicas, particularmente las que combinan la identificación de *C. parvum* y *G. lamblia*, pueden resultar de gran utilidad en los laboratorios.

Finalmente, las técnicas de biología molecular son mucho más sensibles que las precedentes (hasta 1-10 ooquistes/g de heces, según algunos estudios), y específicas. Permiten identificar especies y genotipos, cuantificar y analizar de una vez lotes de muestras, analizar tejidos, realizar estudios retrospectivos sobre muestras de archivo y, sobre todo, caracterizar brotes epidémicos, pero no son técnicas prácticas para el diagnóstico clínico por su complejidad y por la presencia de inhibidores en las heces. Se han empleado métodos de hibridación con sondas de DNA y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de diversos fragmentos de ácidos nucleicos, como RNA ribosómico, los genes HSP70 y COWP y técnicas de RAPD (*random amplification of polymorphic DNA fragments*).

## DECLARACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y ESTUDIO DE UN BROTE

En España la criptosporidiosis no es una enfermedad sujeta a vigilancia, aunque algunas Comunidades Autónomas ya la incorporan a la lista de Enfermedades de Declaración Obligatoria y, en un futuro, está prevista su incorporación en todo el país, siguiendo directrices de la Unión Europea. A pesar de no existir una vigilancia reglada para este patógeno, la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica cuenta con alguna información sobre esta enfermedad en dos de sus sistemas básicos: el Sistema de Brotes y el Sistema de Información Microbiológica.

El Sistema de Información Microbiológica, basado en la notificación semanal voluntaria por parte de los laboratorios de Microbiología Clínica, cubre aproximadamente a un 25% de la población española. Desde 1995 a 2002 se han notificado a este sistema un total de 823 casos de infección por *Cryptosporidium*, lo que supone una media anual de 103 casos.

El Sistema de Brotes analiza los resultados de las investigaciones de los brotes o situaciones epidémicas ocurridos en España, incluyendo los que afectan a turistas extranjeros. Desde 1995 hasta el 2003, este último con datos provisionales, se han notificado a este sistema 11 brotes con un total de 1.455 casos y una media de 132 casos por brote. Las comunidades que han declarado brotes han sido Andalucía (2 brotes), Aragón (2), Baleares (3), Cataluña (1) y Madrid (3). Los ámbitos notificados más frecuentes fueron: el escolar (4), hotel (4), poblacional (2) y picnic (1). El mecanismo de transmisión ha sido hídrico en todos los brotes en los que se conoce este dato (7/11); la fuente de infección se localizó en la red de abastecimiento de aguas en tres ocasiones y en una piscina en otras dos. De los brotes notificados recientemente a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica destaca por su magnitud y por las implicaciones internacionales, el brote ocurrido en Baleares que afectó a 391 turistas británicos, con una piscina como fuente de infección.

Posiblemente, el que no se incluya la identificación de *Cryptosporidium* en el diagnóstico habitual de los laboratorios clínicos sea la causa de que sólo se hayan identificado dos brotes poblacionales. También debería generalizarse su investigación en las aguas en los casos de transmisión hídrica, aún cuando ésta cumpla todos los criterios de potabilidad, dada la resistencia a la cloración del parásito.

Una vez detectado un brote epidémico, es conveniente proceder a la elaboración de una encuesta para la recogida de datos clínicos y epidemiológicos que puedan ser de utilidad para su estudio. La encuesta epidemiológica debe incluir:

- Datos demográficos: nombre, sexo y edad.
- Teléfono.
- Datos clínicos: tipo de diarrea, duración, recurrencias, intervalo entre recurrencias, fiebre, dolor abdominal, vómitos, náuseas, anorexia, pérdida de peso, duración del periodo de excreción de ooquistes y evolución.
- Patología de base: inmunodepresión (VIH, cáncer, leucemia, diálisis renal, tratamiento inmunosupresor, etc.), enfermedad crónica y hospitalización previa.
- Datos epidemiológicos: fecha de inicio de los síntomas, fecha de diagnóstico, lugar de residencia, otros miembros de la familia o vecinos afectados, asistencia a colegio/guardería, otros compañeros de clase afectados, asistencia a comedor escolar, alimento sospechoso consumido, acude a centro de salud, requiere hospitalización, consumo de agua del grifo o embotellada, consumo de leche no pasteurizada, contacto con animales, excursión al campo, baño en piscina, río, lago, pantano, etc., contacto con aguas residuales/fecales, prácticas sexuales.

La revisión de las historias clínicas de los pacientes ingresados, de los informes de urgencias o de los centros de salud, nos facilitará algunos de estos parámetros. La realización de una entrevista telefónica a los padres o a los familiares de los enfermos en los días posteriores al diagnóstico, es de gran importancia para el estudio y la caracterización del brote, pues nos aportará nuevos datos a la encuesta, como identificar a los familiares o vecinos afectados por el mismo cuadro diarreico pero que no acudieron al médico de cabecera o al hospital.

El estudio del brote debe comprender también la caracterización genética de *Cryptosporidium*. Para este fin se han usado prácticamente todas las técnicas de biología molecular conocidas. La técnica más utilizada para identificar especie y genotipo es la PCR-RFLP aunque la técnica de referencia es la PCR seguida de secuenciación directa o tras clonación en un vector (PCR-SA), que es más cara y laboriosa y no apta para grandes series. Se dispone de diversos *locus* para detección y tipificación: la subunidad 18S del RNAr, TS1 y TS2 del DNAr y los genes HSP70 y COWP. El análisis del *locus* 18S del RNAr ha permitido la identificación de todas las especies conocidas hasta ahora y de los dos genotipos predominantes (1 y 2) de *C. parvum*, de subgrupos de éstos y de otros seis genotipos (mono, ratón, cerdo, marsupial, perro y hurón) que también se han encontrado en el hombre. Cuando no se hayan utilizado métodos o procedimientos que diferencien e identifiquen la especie, se recomienda utilizar el término *Cryptosporidium* al emitir el informe.

## MEDIDAS PREVENTIVAS PARA EL CONTROL DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS

La detección y eliminación de los ooquistes de *Cryptosporidium* de las aguas son complejas. Frente a los que argumentan que el control del agua es una tarea difícil, tediosa, ineficaz y de valor limitado, están los que defienden el empleo de métodos, revisados exhaustivamente y validados científicamente, utilizados en muchos países del mundo por las redes distribuidoras de agua, sanidad pública y reguladores, aportando información de valor. Así, en EEUU y el Reino Unido están implantados programas de detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en las aguas.

### Detección de ooquistes en muestras ambientales

Los ooquistes son resistentes a la cloración que se aplica a las aguas de bebida y atraviesan la mayoría de los filtros utilizados en las plantas de tratamiento. Como la concentración de ooquistes suele ser muy baja, para detectarlos es necesario analizar grandes volúmenes de agua, analizando tanto las aguas que llegan como las que salen de la fuente sospechosa. En 1988 se publicaron los resultados del primer estudio de detección de *Cryptosporidium* en el agua. En 1996, trece países estaban ya realizando estas investigaciones y, en 1998, se había comunicado la presencia de ooquistes en aguas residuales, aguas superficiales y aguas potables de diez países. En España, las normas actualmente en vigor no incluyen la detección de *Cryptosporidium*.

Un control correcto nos debería informar sobre la concentración de ooquistes, la especie, el genotipo, la viabilidad y la infectividad para los humanos, pero no es fácil obtener toda esta información. En EEUU se siguen las normas de la EPA (*Environmental Protection Agency*) para detección y cuantificación de ooquistes de *Cryptosporidium* (método 1622) o de *Cryptosporidium* y *Giardia* (método 1623) en las aguas; el proceso consta de cuatro fases: a) concentración de ooquistes por filtración, elución y centrifugación, b) purificación en gradiente de densidad o por separación inmunomagnética (IMS) con perlas recubiertas con anticuerpos anti-pared del ooquiste, c) observación y recuento de los ooquistes por IF, y d) confirmación mediante tinción vital (4',6-diamino-2-fenilindol, DAPI) y microscopía de contraste de fases interferencial. Este método, aunque es más sensible y más específico que sus predecesores, no es óptimo. Tiene además otros problemas como la necesidad de filtrar de 10 a 100 l de agua, la diferente eficiencia de los filtros, el efecto inhibitor de las aguas ricas en hierro sobre la IMS, que provoca falsos negativos, las reacciones cruzadas con otras especies de *Cryptosporidium* y con algas y el no diferenciar especies, por lo que se han propuesto modificaciones y alternativas que han sido descritas exhaustivamente por Quintero-Betancourt *et al*.

Existe un inmunoensayo de captura del antígeno de la pared del ooquiste, específico de *C. parvum*, que se aplica a los ooquistes solubilizados y es altamente sensible (un ooquiste) incluso a partir de aguas muy turbias; tiene las ventajas añadidas de la rapidez y la automatización aunque no nos proporciona información sobre el genotipo, la viabilidad ni la infectividad.

### Valoración de la infectividad y la viabilidad

Los ooquistes persisten en el ambiente por largos períodos pero su viabilidad y capacidad infectiva decrecen con el tiempo. Para valorar correctamente la contaminación de las aguas por *Cryptosporidium* hay que analizar de alguna forma estos dos parámetros. Entre las técnicas para medir la viabilidad de los ooquistes se encuentran la exclusión del yoduro de propidio, la tasa de exquistación, la detección del RNAm de HSP70 mediante RT-PCR o NASBA (amplificación isotérmica basada en la secuencia de ácidos nucleicos). Esta técnica tiene la ventaja sobre la PCR de que es isotérmica, no se producen interferencias de fragmentos genómicos y es más rápida que la PCR convencional.

La infectividad se mide por la capacidad de los ooquistes para infectar *in vitro* líneas celulares epiteliales. Los genotipos 1 y 2 de *C. parvum* pueden cultivarse en HCT-8 (células de carcinoma íleocecal humano) y Caco-2 (células de cáncer de colon humano). Los ooquistes extraídos de concentrados de aguas se añaden a monocapas celulares y los focos de infección se identifican mediante IF o PCR. Por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-esporozoito/merozoito se llega a detectar un sólo quiste infeccioso por muestra. El cultivo no se afecta por los inhibidores presentes en el agua, únicamente detecta quistes infecciosos, los resultados concuerdan con los de infectividad en ratón y son cuantitativos. Los inconvenientes que presenta son la complejidad de la técnica y el tiempo necesario (24-72 h).

### Higienización de las aguas

Existe una gran variedad de tratamientos, de los que el cloro y el ozono son los más extensamente utilizados. La cloración es el método empleado en España y en casi toda Europa y países del Mediterráneo; sin embargo, no es completamente eficaz frente a los ooquistes de *Cryptosporidium*, que poseen una gruesa pared que los hace resistentes.

El ozono es el oxidante más importante que puede producirse industrialmente de forma económica y se utiliza desde principios del siglo pasado en Francia; posteriormente se ha extendido a Alemania, Holanda, Suiza y a otros países de Europa y más recientemente a Canadá. Se ha utilizado para eliminar el color, olor y sabor del agua. Como desinfectante tiene el mayor potencial de oxidación de todos los empleados para el agua, sin el inconveniente de añadir productos químicos y sin dejar residuos y es más efectivo que los desinfectantes químicos frente a los ooquistes de *Cryptosporidium*; en medio acuoso produce unos radicales libres que alteran la permeabilidad de la pared del ooquiste y después su DNA. También tiene inconvenientes: la cantidad de ozono necesaria para matar los ooquistes es muy superior a la necesaria para eliminar los contaminantes bacterianos del agua y su efectividad depende de la temperatura, tiempo de contacto, pH y otras características del agua. Además, en presencia de bromuros, el ozono forma bromatos que son cancerígenos. En aguas embotelladas la cantidad de ozono se limita a 0,4 mg/l de agua en el producto final, que no asegura la eliminación total de los quistes.

A principios de 1900 se utilizó la radiación UV para eliminar los coliformes del agua. Se trata de un proceso puramente físico que se ha demostrado altamente eficaz para la inactivación de protozoos; es rápido y no deja residuos tóxicos. Tanto las irradiaciones de



UV a mediana presión como a baja se han mostrado altamente efectivas para la eliminación de ooquistes en el agua de bebida, pero quedan ciertas cuestiones sin resolver, como la evaluación del tipo de lámparas, el tipo de reacción y la monitorización de las mismas.

La filtración, proceso físico que elimina las partículas suspendidas en el agua, es un gran paso en el tratamiento de las aguas municipales. El agua se mezcla con un coagulante que ayuda a sedimentar las partículas en suspensión más groseras y el agua clarificada es tratada mediante filtros o lechos de arena que eliminan más partículas y protozoos. Existen filtros de superficie y de profundidad y, según el poro, se clasifican en filtros nominales o filtros absolutos. La filtración por ósmosis inversa elimina los ooquistes de *Cryptosporidium* y *G. lamblia*, independientemente del origen del agua. Para la erradicación total de los ooquistes de *Cryptosporidium* de las aguas de bebida, estas deben tratarse por destilación, filtración, ósmosis inversa o bien por filtros absolutos de 1  $\mu\text{m}$  o menos.

## PREVENCIÓN DE LA EXPOSICIÓN

En los pacientes inmunodeprimidos deben minimizarse los riesgos de contagio. La prevención de la criptosporidiosis incluye la información sobre las distintas vías de transmisión de la infección y, además, el consejo sobre la práctica de ciertas medidas preventivas como las que indicamos a continuación.

### Agua y alimentos

- Hervir el agua al menos 1 min, almacenarla en recipientes limpios y con tapa, evitar cualquier tipo de manipulación del interior y la tapa.
- Filtrar el agua del grifo con filtros caseros que pueden ser de ósmosis inversa o absolutos con poro de 1  $\mu\text{m}$ . Cambiar periódicamente los cartuchos del filtro o membranas.
- Beber agua embotellada, asegurándose que ésta ha sido tratada previamente por técnicas que erradiquen por completo a *Cryptosporidium*.
- No es recomendable consumir cubitos de hielo fabricados a partir de agua del grifo.
- No se debe beber agua directamente de ríos, lagos, piscinas, parques acuáticos, fuentes ornamentales y playas, incluso de agua salada.
- Evitar tragar agua durante la realización de actividades lúdico-deportivas.
- Evitar comer marisco crudo.
- Pelar la fruta y lavar los vegetales que vayan a ser consumidos crudos.

Es conveniente conocer que los productos lácteos pasteurizados aseguran la erradicación total de *Cryptosporidium*, pues el calor destruye los ooquistes, y que las bebidas carbonatadas embotelladas o enlatadas, tales como soda o cerveza, son, por lo general, calentadas o filtradas en forma suficiente para eliminar los quistes.

### Otras precauciones

- Lavado de manos con agua y jabón
  - Después de ir al baño o de cambiar pañales.
  - Después de manejar animales o de limpiar sus excrementos.
  - Después de trabajar con la tierra o tocar objetos que pudieran estar contaminados con material fecal.
  - Antes de preparar, servir, o comer alimentos.
- En los hospitales:
  - Utilización de guantes y lavado de manos tras quitarse los guantes

