

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS SUBVENCIONADA POR LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
ANTONIO ABAD DEL CUSCO

Evaluación de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.* en el cuerpo lenticó de Piuray por Pruebas de Certeza Parasitológica y PCR en Tiempo Real.

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO

**PRESENTADO POR** : Fernández Baca Campos, Martha Vanessa.  
Mamani Liconá, Freja Maribel.

**ASESORA** : Master. Blga. Flavia Caroll Muñiz Pareja.

**COASESOR** : M.Sc. MD. Miguel M. Cabada Samame.

CUSCO – PERÚ.

2016

## DEDICATORIA

*La vida tiene muchos retos, y uno de ellos es la universidad, agradezco infinitamente a mis padres Raúl y Encarnación por darme la vida, su siempre apoyo y confianza, a mi hermano Raúl Haither por ser mi guía, espejo en el cual me quiero reflejar por sus virtudes y gran corazón, a mi hermana Lisbet Rocio a la cual espero servir de inspiración en sus sueños y metas, gracias a la vida por este triunfo*

*Frecia*

*A mi abuelo Julio, porque esta meta alcanzada es el producto de su amor y enseñanzas.*

*A Julio por haber estado a mi lado cuándo más lo necesité, a Eliana por enseñarme a ser fuerte, a Daniel y Fabricio por su amistad y complicidad.*

*A Vilma, por todo el apoyo incondicional.*

*A Jacko, porque estás conmigo cada día de mi vida.*

*Vanessa.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestras familias por su ternura, paciencia y apoyo.

A la Master Blga Flavia Carroll Muñiz Pareja, por el asesoramiento de este trabajo, por su capacidad para guiar nuestras ideas, su valiosa dirección y apoyo pero sobretodo su aporte no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en nuestra formación como investigadoras.

Al MD. M.Sc. Miguel M. Cabada Samame, Jefe del Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por permitirnos el ingreso al laboratorio y por darnos la oportunidad de iniciarnos en el mundo de la investigación; y a todo el personal que nos acogió cariñosamente.

A M Sc. Ing. Biotecnólogo José Luis Málaga Granda, Jefe del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por compartir sus años de experiencia y conocimientos en Biología Molecular y ayudarnos a culminar el trabajo de investigación

A la Universidad de Texas Medical Branch, EE.UU por el envío de materiales necesarios para la elaboración del trabajo de investigación.

A nuestros amigos por todo el apoyo brindado

## INDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA: .....	4
JUSTIFICACIÓN: .....	5
OBJETIVOS: .....	6
OBJETIVO GENERAL: .....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	6
HIPÓTESIS: .....	7
CAPITULO I - MARCO TEÓRICO .....	8
1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES .....	8
1.2. ANTECEDENTES NACIONALES. ....	11
1.3. ANTECEDENTES LOCALES. ....	12
1.4. DESCRIPCIÓN DE <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	13
1.4.1. POSICIÓN TAXONÓMICA DE <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	13
1.4.2. MORFOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA DE <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	13
1.4.2.1. OOQUISTES.....	14
1.4.2.2. ESPOROZOITOS.....	15
1.4.2.3. TROFOZOITO. ....	16
1.4.2.4. MERONTE TIPO I Y TIPO II. ....	16
1.4.2.5. MEROZOITOS.....	17
1.4.2.6. MACROCIGOTOS Y MICROCIOTOS.....	17
1.4.2.7. MICROGAMETOS Y MACROGAMETOS.....	17
1.4.3. CICLO BIOLÓGICO DE <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	18
1.4.4. EFECTOS EN EL HOSPEDADOR.....	21
1.4.4. EPIDEMIOLOGÍA. ....	22
1.4.4.1. MEDIDAS PREVENTIVAS. ....	23
1.5. DESCRIPCIÓN DE <i>Giardia sp.</i> .....	24
1.5.1. POSICIÓN TAXONÓMICA DE <i>Giardia sp.</i> .....	24
1.5.2. MORFOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA DE <i>Giardia sp.</i> .....	25
1.5.2.1. TROFOZOITO O FORMA VEGETATIVA. ....	25
1.5.2.2. QUISTE O FORMA INFECTIVA. ....	28
1.5.3. CICLO BIOLÓGICO DE <i>Giardia sp.</i> .....	29
1.5.4. EFECTOS EN EL HOSPEDADOR.....	33

1.5.5.	EPIDEMIOLOGIA.....	34
1.5.5.1.	MEDIDAS PREVENTIVAS.....	35
1.6.	EL AGUA COMO MEDIO DE TRANSMISIÓN DE OOQUISTES Y QUISTES.....	35
1.7.	LEGISLACIÓN MEDIO AMBIENTAL DS N° 002–2008–MINAM - ARTÍCULO 1° “APROBACIÓN DE LOS ESTÁNDARES NACIONALES DE CALIDAD AMBIENTAL PARA AGUA” .....	37
1.8.	LEGISLACIÓN MEDIO AMBIENTAL DS N° 015-2015-MINAM:.....	38
1.9.	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	40
1.9.1.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (Mullis, Kary; 1985) (56).....	40
1.9.2.	PCR EN TIEMPO REAL(HIGUCHI Y COLABORADORES, 1992) POR SYBR GREEN (59).....	40
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....		43
2.1.	ÁREA DE ESTUDIO .....	43
2.1.1.	CARACTERÍSTICAS GEOMORFOLÓGICAS.....	44
2.1.2.	ACCESIBILIDAD AL LUGAR DE ESTUDIO.....	44
2.1.3.	FLORA Y FAUNA.....	44
2.1.4.	CLIMA .....	45
2.1.5.	CLIMATODIAGRAMA DE LA ESTACIÓN METEOROLÓGICA DE URUBAMBA DURANTE EL AÑO 2015 .....	46
2.1.6.	PUNTOS DE MUESTREO.....	51
2.2.	MATERIALES .....	47
2.2.1.	MATERIAL BIOLÓGICO.....	47
2.2.2.	MATERIALES DE CAMPO .....	47
2.2.3.	MATERIALES PARA PRUEBAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA.....	48
2.2.3.1.	SOLUCIONES PARA PRUEBAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA .....	48
2.2.3.2.	EQUIPOS PARA PRUEBAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA.....	48
2.2.4.	MATERIAL DE LABORATORIO PARA PRUEBAS MOLECULARES .....	48
2.2.4.1.	MATERIAL BIOLÓGICO PARA PRUEBAS MOLECULARES.....	49
2.2.4.2.	REACTIVOS PARA PRUEBAS MOLECULARES.....	49
2.2.4.3.	EQUIPOS PARA PRUEBAS MOLECULARES .....	50
2.3.	MÉTODOS.....	50
2.3.1.	UNIVERSO MUESTRAL .....	51
2.3.2.	TOMA DE MUESTRA .....	53
2.3.3.	PRUEBAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA:.....	54
2.3.3.1.	TÉCNICA DE SEDIMENTACIÓN SIMPLE POR GRAVEDAD Y CENTRIFUGACIÓN BASADOS EN: METHODS OF MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF WASTEWATER: VARGAS C, 1983.....	54

2.3.3.1.1 FUNDAMENTO: .....	54
2.3.3.1.2. PROCEDIMIENTO:.....	54
2.3.3.2.TÉCNICA DE SHEATHER – SUGAR POR FLOTACIÓN CON CENTRIFUGACIÓN PARA QUISTES Y OOQUISTES (SHEATHER, JOSEPH WILLIAM GEORGE; 1923) (68).....	55
2.3.3.2.1. FUNDAMENTO. ....	55
2.3.3.2.2. PROCEDIMIENTO.....	56
2.3.3.3. TÉCNICA DE CERTEZA PARASITOLÓGICA COLORACIÓN KINYOUN PARA COCCIDIOS (KINYOUN, JOSEPH JAMES; 1915) (68).....	57
2.3.3.3.1. FUNDAMENTO. ....	57
2.3.3.3.2. PROCEDIMIENTO.....	57
2.3.3.4. TÉCNICA DE FÓRMOL – ÉTER PARA HUEVOS Y LARVAS DE HELMINTOS (TÉCNICA DE NICOLL, CHARLES Y BARTHELEMY, JEAN AUGUSTE; 1917).....	58
2.3.3.4.1. FUNDAMENTO .....	58
2.3.3.4.2. PROCEDIMIENTO.....	58
2.3.4. TÉCNICAS MOLECULARES.....	58
2.3.4.1. EXTRACCIÓN DE ADN POR MAG BIND SOIL DNA KIT. ....	58
2.3.4.1.1. FUNDAMENTO.....	58
2.3.4.1.2. PROCEDIMIENTO.....	59
2.3.4.2. PCR EN TIEMPO REAL .....	62
2.3.4.2.1. FUNDAMENTO.....	62
2.3.4.2.2. PROCEDIMIENTO.....	62
2.3.4.3. ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL PARA <i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Giardia intestinalis</i> .....	63
2.3.4.3.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL PARA <i>Cryptosporidium parvum</i> . 63	
2.3.4.3.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR PARA <i>Giardia intestinalis</i> . ....	65
2.4. ANALISIS DE DATOS.....	67
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	68
3.1. RESULTADOS POR TÉCNICAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA EN EL CUERPO LÉNTICO DE PIURAY, DURANTE EL PERIODO JULIO 2015 A FEBRERO 2016.....	68
3.1.1. RESULTADOS POR LA TÉCNICA SHEATHER – COLORACIÓN KINYOUN PARA <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	68
3.1.2. RESULTADOS POR LA TÉCNICA SHEATHER – LUGOL DOBELL O´ CONNOR PARA <i>Giardia</i> <i>sp.</i> .....	72
3.2. RESULTADOS POR LA TÉCNICA MOLECULAR PCR EN TIEMPO REAL EN EL CUERPO LÉNTICO DE PIURAY DURANTE EL PERIODO JULIO 2015 A FEBRERO 2016. ....	74

3.2.1. RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE LAS MUESTRAS DE ADN EXTRAÍDAS.....	74
3.2.2. LÍMITE DE DETECCIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL PARA <i>Cryptosporidium parvum</i> : .	75
3.2.3. PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNOSTICO DE <i>Cryptosporidium parvum</i> :.....	76
3.2.4. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL PCR EN TIEMPO REAL PARA <i>Giardia intestinalis</i> . ....	83
3.2.5. PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNOSTICO DE <i>Giardia intestinalis</i> :.....	85
3.3. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR PRUEBAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA Y PCR EN TIEMPO REAL.....	87
3.4. DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE <i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Giardia intestinalis</i> POR PCR EN TIEMPO REAL. ....	89
3.3. APLICACIÓN DE LA PRUEBA ESTADÍSTICA t- STUDENT DE LOS RESULTADOS POSITIVOS POR PCR PARA <i>Cryptosporidium parvum</i> . ....	90
3.3.1. APLICACIÓN DE LA PRUEBA ESTADÍSTICA t - STUDENT PARA EVALUAR DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DE LA PRESENCIA DE <i>Cryptosporidium parvum</i> EN LOS MESES CON AUSENCIA Y PRESENCIA DE LLUVIA.....	90
3.3.2. APLICACIÓN DE LA PRUEBA ESTADÍSTICA DE ANOVA PARA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DE LA PRESENCIA DE <i>Cryptosporidium parvum</i> EN LOS DIFERENTES PUNTOS DE MUESTREO. ....	92
CONCLUSIONES: .....	95
RECOMENDACIONES .....	96
BIBLIOGRAFÍA: .....	97
ANEXOS .....	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Ooquistes de <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	15
Figura N° 2: Ciclo Biológico de <i>Cryptosporidium sp.</i> .....	20
Figura N° 3: Trofozoito de <i>Giardia intestinalis</i> .....	27
Figura N° 4: Potencial Zoonótico de <i>Giardia intestinalis</i> .....	30
Figura N° 5: Ciclo Biológico de <i>Giardia intestinalis</i> .....	32
Figura N° 6: Gráfico de amplificación que genera el PCR en tiempo real: La fluorescencia emitida en el momento que la sustancia intercalante se une al ADN vs. el número de ciclos. ....	42
Figura N° 7: Mapa satelital de la ubicación geográfica del cuerpo léntico de Piuray. ....	43
Figura N° 8: Climatodiagrama en base a los resultados obtenidos de la Estación Meteorológica del Senamhi en Urubamba durante el año 2015.....	47
Figura N° 9: Mapa satelital de los puntos de muestreo en el cuerpo léntico de Piuray. ....	51
Figura N° 10: Protocolo del termociclador para PCR en tiempo real de <i>Cryptosporidium parvum</i> , estandarizado según las temperaturas indicadas en los primers.....	65
Figura N° 11: Protocolo del termociclador para PCR en tiempo real de <i>Giardia intestinalis</i> , estandarizado según las temperaturas indicadas en los primers. .	67
Figura N° 12: Ooquistes de <i>Cryptosporidium sp.</i> , con técnica de certeza parasitológica (coloración Kinyoun), encontrados en el punto de Escuela de Pongobamba a 10000X, considerando una ampliación de cámara de 10X. ....	69
Figura N° 13: Ooquistes de <i>Cryptosporidium sp.</i> , con técnica de certeza parasitológica - coloración Kinyoun, encontrados en el punto de muestreo de Cuper Bajo a 10000X, considerando una aplicación de cámara de 10X.....	70
Figura N° 14: Ooquistes de <i>Cryptosporidium sp.</i> , con técnica de certeza parasitológica - coloración Kinyoun, encontrados en el punto de muestreo de Ravilchaca a 10000X, considerando una aplicación de cámara de 10X. ....	70
Figura N° 15: Ooquistes de <i>Cryptosporidium sp.</i> , con técnica de certeza parasitológica - coloración Kinyoun, encontrados en el punto de muestreo de Entrada 10000X, considerando una aplicación de cámara de 10X. ....	71
Figura N° 16: Ooquistes de <i>Cryptosporidium sp.</i> , con técnica de certeza parasitológica (coloración Kinyoun), encontrados en el punto de muestreo Caparay 10000X, considerando una aplicación de cámara de 10X. ....	71
Figura N° 17: Ooquistes de <i>Giardia sp.</i> , con técnica de certeza parasitológica Sheather – Lugol Dobell & O’Connor, encontrados en el punto de muestreo Caparay 10000X, considerando una aplicación de cámara de 10X. ....	73
Figura N° 18: Curvas de límite de detección para <i>Cryptosporidium parvum</i> en PCR en tiempo real. ....	75



Figura N° 19 A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para <i>Cryptosporidium parvum</i> , en cada punto de muestreo del cuerpo lenticó de Piuray durante el mes de Julio 2015, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos .....	77
Figura N° 20: A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para <i>Cryptosporidium parvum</i> , en cada punto de muestreo del cuerpo lenticó de Piuray durante el mes de Agosto 2015, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos.....	78
Figura N° 21: A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para <i>Cryptosporidium parvum</i> , en cada punto de muestreo del cuerpo lenticó de Piuray durante el mes de Septiembre 2015, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos.....	78
Figura N° 22: A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para <i>Cryptosporidium parvum</i> , en cada punto de muestreo del cuerpo lenticó de Piuray durante el mes de Octubre 2015, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos.....	79
Figura N° 23: A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para <i>Cryptosporidium parvum</i> , en cada punto de muestreo del cuerpo lenticó de Piuray durante el mes de Noviembre 2015, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos.....	80
Figura N° 24: A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para <i>Cryptosporidium parvum</i> , en cada punto de muestreo del cuerpo lenticó de Piuray durante el mes de Diciembre 2015, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos.....	80
Figura N° 25: A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para <i>Cryptosporidium parvum</i> , en cada punto de muestreo del cuerpo lenticó de Piuray durante el mes de Enero 2016, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos.....	81
Figura N° 26: Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para <i>Cryptosporidium parvum</i> , en cada punto de muestreo del cuerpo lenticó de Piuray durante el mes de Febrero 2016. ....	82
Figura N° 27: Resultados Positivos de la Prueba Molecular de PCR en tiempo real para <i>Cryptosporidium parvum</i> , obtenidos en 10 puntos muestrales del cuerpo lenticó de Piuray durante 8 meses. ....	82
Figura N° 28: Curvas del límite de detección de <i>Giardia intestinalis</i> para PCR en tiempo real, siendo el límite mínimo de detección: 1.94 pg/μl. ....	84
Figura N° 29: Curvas de resultados por PCR en tiempo real de <i>Giardia intestinalis</i> durante el mes de Febrero 2016 en muestras del cuerpo lenticó de Piuray. ....	86
Figura N° 30: Distribución la frecuencia de los resultados positivos de <i>Giardia intestinalis</i> y <i>Cryptosporidium parvum</i> obtenidos por PCR en tiempo real, aplicado en los puntos de muestreo del cuerpo de agua lenticó de Piuray en el periodo de Julio 2015 a Febrero 2016.....	89

Figura N° 31: Distribución de t - Student para evaluar la diferencia significativa de la presencia de <i>Cryptosporidium parvum</i> en los meses con ausencia y presencia de lluvia.....	91
Figura N° 32: Distribución Anova para evaluar la diferencia significativa de la presencia de <i>Cryptosporidium parvum</i> en los diferentes puntos de muestreo	93
Figura N° 33-37: Larvas de <i>Strongylos</i> (33, 34, 35), Huevos de Nemátodo (36) y Nemátodo de vida libre (37) encontrados mediante la técnica de Formol – éter en el cuerpo léntico de Piuray, durante los meses Julio 2015 a Febrero 2016, observados al microscopio a 40X, con una amplificación de cámara a 10X. .	107
Figura N° 34, .....	107
Figura N° 35 .....	107
Figura N° 36 .....	107
Figura N° 37 .....	107
Figura N° 38: Mapa del cuerpo léntico de Piuray, tomado del letrero de la zona de Alapchaca, dónde se observa los diferentes centros poblados alrededor del cuerpo de agua. ....	108
Figura N° 39: Fotografía del GPS map 76s (GARMIN), utilizado para la presente investigación.....	108
Figura N° 40: Toma de muestra en el cuerpo léntico de Piuray .....	108
Figura N° 41: Punto Sipicunapampa, se usaron guantes de látex cómo medida de bioseguridad y baldes de polipropileno enjuagados, limpios y con previo enjuague con agua del .....	108
Figura N° 42: Toma de muestra en el cuerpo léntico de Piuray; en el punto de Sipicunapampa.....	108
Figura N° 43: Ganado pastando a la orilla del cuerpo léntico de Piuray, en el punto de muestreo de Cúper Bajo.....	108
Figura N° 44: Toma de muestra en el cuerpo léntico de Piuray, en el punto Cuper Bajo. ....	108
Figura N° 45: Toma de muestra en el punto Ocutuan .....	108
Figura N° 46: Se observa contaminación en el punto Escuela.....	108
Figura N° 47: Toma de muestra en el punto Escuela.....	108
Figura N° 48: Toma de muestra en punto ENT .....	108
Figura N° 49: Contaminación en PT .....	108
Figura N° 50: Se observa contaminación en el punto Escuela.....	108
Figura N° 51: Toma de muestra punto Caparay.....	108
Figura N° 52: Contaminación con residuos sólidos en Caparay.....	108
Figura N° 53: Punto Entrada “Captación del Sistema Piuray” .....	108
Figura N° 54: Punto Entrada con presencia de ganado pecuario y utilizado como área de cultivo .....	108
Figura N° 55: Punto Entrada se observó un tractor para realizar cultivo .....	108
Figura N° 56: Toma de muestra del punto Entrada .....	108
Figura N° 57: Toma de muestra del punto Entrada .....	108
Figura N° 58: Toma de muestra punto Huilla – Huilla (tributario) .....	108
Figura N° 59: Punto Huilla – Huilla contaminación del agua .....	108

Figura N° 60: Punto Huilla – Huilla contaminación fecal de animales .....	108
Figura N° 61: Traslado de los baldes a la ciudad del Cusco, para ser procesados en los laboratorios de Parasitología en la Escuela Profesional de Biología .....	108
Figura N° 62: Sedimentación por gravedad simple durante 24 horas, para obtener sedimento y posteriormente, descartar aproximadamente 12 L de sobrenadante. ....	108
Figura N° 63: Concentración del sedimento 8L .....	108
Figura N° 64: 8 envases de 1 litro .....	108
Figura N° 65: Centrifugación en tubos de 50mL, en la centrifugadora Centrifuga Modelo AG Centrifuge 5810 (EPPENDORF), a 2300 RPM durante 5 minutos.....	108
Figura N° 66: Tubos de 50 ml para obtener el sedimento .....	108
Figura N° 67: Obtención los frascos de sedimento obtenido por cada punto de muestreo y almacenados de acuerdo al procedimiento que se utilizó. ....	108
Figura N° 68: Muestras seleccionadas, dónde se descartó el sobrenadante y se mantuvo 20 ml del sedimento.....	108
Figura N° 69: Se Agregó solución Sheather- sugar saturada y se mezcló con la ayuda de un vortéx para homogenizar bien las muestras. ....	108
Figura N° 70: procedimientos para la técnica de Flotación Sheather.....	108
Figura N° 71 : Solución Sheather basado em el Manual INS 2003 .....	108
Figura N° 72: Se observó la superficie del sobrenadante con una gota de lugol parasitológico a microscopio, a 4X, 10X y 40X. ....	108
Figura N° 73: Extendido de las muestras, fijadas con metanol. ....	108
Figura N° 74: Coloración de las láminas con Fucsina fenicada durante 30 minutos.....	108
Figura N° 75: Batería de coloración Kinyoun .....	108
Figura N° 76: Decoloración con alcohol acido durante 1 minuto. ....	108
Figura N° 77: Coloración con el colorante de contraste: azul de metileno durante1 minuto. ....	108
Figura N° 78: Láminas secadas a temperatura ambiente, para su posterior observación a 100X en el microscopio.....	108
Figura N° 79: Muestras seleccionadas para prueba de certeza parasitológica: formol – éter. Dónde se Descartó el sobrenadante y se mantuvor 30ml del sobrenadante y se agregó 10 ml de formol al 10%. ....	108
Figura N° 80: Formol al 10% .....	108
Figura N° 81: se agitó efusivamente durante 20 segundos.....	108
Figura N° 82: Se agregó 5 ml de Eter .....	108
Figura N° 83: Centrifugar a 2300 rpm por 2 min.....	108
Figura N° 84: Dos capas, se descarta el sobrenadante. ....	108
Figura N° 85: El sedimento. Posteriormente, el sedimento fue leído en placa a 4X y 10X en el microscopio.....	108
Figura N° 86: Muestras seleccionadas de cada punto para la extracción de ADN.....	108

Figura N° 87: Pesar 500 mg de perlas de vidrio (beats).....	108
Figura N° 88: Desinfección la cámara de bioseguridad con lejía al 5 % para iniciar el procedimiento de extracción. ....	108
Figura N° 89: Protocolo de extracción Mag Bind Soil DNA kit.....	108
Figura N° 90: Inhibidores de las DNAsas .....	108
Figura N° 91: vortex, para que los beats rompan las estructuras y liberen el ADN.....	108
Figura N° 92: Shock térmico.....	108
Figura N° 93: Sobrenadante trasvasado a microtubos de 2mL libre de DNAsas .....	108
Figura N° 94: Muestras debidamente rotulados .....	108
Figura N° 95: Ultracentrifuga .....	108
Figura N° 96: Se continuó con el protocolo de extracción Mag Bind DNA Soil Kit, agregando los reactivos en orden establecido. ....	108
Figura N° 97: los buffers respectivos para el proceso de lavado fueron agregados .....	108
Figura N° 98: El ADN se adhiere a las partículas CND .....	108
Figura N° 99: Se observa la adhesión de las partículas de CND a la placa magnética .....	108
Figura N° 100: Descartar el sobrenadante sin mover las particular de CND adheridas.....	108
Figura N° 101: Se observa las partículas CND que contienen ADN .....	108
Figura N° 102: Retiramos el sobrenadante, para obtener las partículas CND pegados a la placa .....	108
Figura N° 103: Se continuó con el protocolo de extracción, agregando y retirando las soluciones de lavado .....	108
Figura N° 104: Secar las partículas de CND durante una a dos horas, para que el etanol sobrenadante se evapore. ....	108
Figura N° 105: Agregar el buffer elution e incubar a temperatura ambiente .	108
Figura N° 106: La elucion obtenida se lee por espectrofotometría Nanodrop 2000 .....	108
Figura N° 107: rotular la concentracion y pureza. ....	108
Figura N° 108: Muestras de ADN de cada punto de muestreo, primer y Sso Advance, conservados a -4°C, se descongelaron y se realizó un vortex y un spin down para la corrida de PCR.....	108
Figura N° 109: Master Mix.....	108
Figura N° 110: Agua libre de Nucleasas .....	108
Figura N° 111: Sso Advance Universal SYBR Green Super Mix.....	108
Figura N° 112: Se distribuyó 18µL de Master Mix en los pozos de corrida del PCR.....	108
Figura N° 113: Sellar los pozos con el syler, para evitar evaporación de muestras en el termociclador. ....	108
Figura N° 115: Termociclador programado con los protocolos.....	108
Figura N° 114: colocaron los pozos en el Termociclador .....	108

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Estándares de Calidad Ambiental para aguas D.S. N° 002-2008-MINAM .....	38
Tabla N° 2: Modificación de Estándares de calidad ambiental para agua DS N° 015-2015-MINAM .....	39
Tabla N° 3: Registro de Temperaturas, Precipitaciones y Radicación UV registrados para la zona del cuerpo léntico de Piuray en el periodo de Julio a Diciembre del 2015 a Enero -Febrero del 2016.....	46
Tabla N° 4: Posicionamiento geográfico y fechas de muestreo realizadas en el cuerpo léntico de Piuray durante el periodo Julio 2015 a Febrero 2016. ....	53
Tabla N° 5: Distribución de los resultados de la técnica de certeza parasitológica coloración Kinyoun para <i>Cryptosporidium sp.</i> ....	68
Tabla N° 6: Resultados de la técnica de certeza parasitológica Sheather – Lugol parasitológico Dobell O’connor para evaluar <i>Giardia sp.</i> ....	72
Tabla N° 7: Concentración del ADN extraído en los 10 puntos muestrales del cuerpo léntico de Piuray durante el periodo Julio 2015 a Febrero 2016. ....	74
Tabla N° 8: Pureza del ADN extraído en los 10 puntos de muestreo del cuerpo léntico de Piuray durante el periodo Julio 2015 a Febrero 2016. ....	75
Tabla N° 9: Resultados de la Técnica Molecular de PCR en tiempo real para <i>Cryptosporidium parvum</i> , en 10 puntos muestrales del cuerpo léntico de Piuray durante el periodo Julio 2015 a Febrero 2016.....	76
Tabla N° 10: Resultados de la Técnica Molecular de PCR en Tiempo real para <i>Giardia intestinalis</i> , en 10 puntos muestrales del cuerpo léntico de Piuray durante el periodo Julio 2015 a Febrero 2016.....	85
Tabla N° 11: Resultados de las pruebas empleadas para el diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> , durante los meses de ausencia y presencia de lluvias en cada punto de muestreo. ....	87
Tabla N° 12: Resultados de las pruebas empleadas para el diagnóstico de <i>Giardia</i> durante los meses de ausencia y presencia de lluvias en cada punto de muestreo. ....	88
Tabla N° 13: Promedios de la presencia de <i>Cryptosporidium parvum</i> en los meses con ausencia y presencia de lluvia. ....	90
Tabla N° 14: Prueba de t - Student para evaluar la diferencia significativa de la presencia de <i>Cryptosporidium parvum</i> en los meses con ausencia y presencia de lluvia. ....	91
Tabla N° 15: Promedios positivos a <i>Cryptosporidium parvum</i> por PCR en tiempo real de los puntos de muestreo frente a la ausencia y presencia de lluvia. ....	92
Tabla N° 16: Análisis de Varianza ANOVA para evaluar diferencia significativa de la presencia de <i>Cryptosporidium parvum</i> en los diferentes puntos de muestreo. ....	93

Tabla N° 17: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Julio 2015 para <i>Cryptosporidium sp.</i> , y <i>Giardia sp.</i> .....	103
Tabla N° 18: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Agosto 2015 para <i>Cryptosporidium sp.</i> y <i>Giardia sp.</i> .....	103
Tabla N° 19: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Septiembre 2015 para <i>Cryptosporidium sp.</i> y <i>Giardia sp.</i> .....	104
Tabla N° 20: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Octubre 2015 para <i>Cryptosporidium sp.</i> y <i>Giardia sp.</i> .....	104
Tabla N° 21: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Noviembre 2015 para <i>Cryptosporidium sp.</i> y <i>Giardia sp.</i> .....	105
Tabla N° 22: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Diciembre 2015 para <i>Cryptosporidium sp.</i> y <i>Giardia sp.</i> .....	105
Tabla N° 23: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Enero 2016 para <i>Cryptosporidium sp.</i> y <i>Giardia sp.</i> .....	106
Tabla N° 24: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Febrero 2016 para <i>Cryptosporidium sp.</i> y <i>Giardia sp.</i> .....	106
Tabla N° 25: Resultados por pruebas de certeza parasitológica Formol – éter, durante los meses Julio 2015 a Febrero 2016. ....	107

## RESUMEN

*Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.*, son parásitos protozoos catalogados por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC de Atlanta), como “patógenos emergentes”, debido a que causan diarreas gastrointestinales al ser ingeridos en aguas contaminadas, siendo considerados como indicadores de la calidad del agua por resistir a los procesos convencionales de potabilización. El objetivo principal del presente estudio fue evaluar la presencia de *Cryptosporidium sp.*, y *Giardia sp.*, en 80 muestras de agua provenientes del cuerpo léntico de Piuray; fuente principal de abastecimiento de agua para la ciudad del Cusco, evaluando 10 puntos de muestreo seleccionados según las características del entorno, en el periodo de julio 2015 a Febrero 2016; (época ausencia y presencia de lluvias). Las muestras fueron procesadas mediante pruebas de certeza parasitológica: técnica de flotación Sheather-Sugar, coloración Lugol-Dobell O’Connor, coloración Kinyoun y la técnica molecular de PCR en tiempo real, utilizando los primers para *Cryptosporidium sp.* Fw: 5’ CTC CAC CAA CTA AGA ACG GCC 3’ y Rv: 5’ TAG AGA TTG GAG GTT GTT CCT 3’ y los primers para *Giardia sp.* Fw: 5’ GAC GGG TCA GGA CAA CGG TT 3’ y Rv 5’ TTG CCA GCG GTG TCC G 3’ (diseñados por A. Castellanos y Z. Crannell, Texas – EE.UU, respectivamente). De las 80 muestras procesadas por la técnica Sheather – coloración Kinyoun el 50% de las muestras fueron positivas a *Cryptosporidium sp.*, mientras que la PCR en tiempo real resultó con el 56.25% de muestras positivas a *Cryptosporidium parvum*, por otro lado *Giardia intestinalis*, resultó con 2.5% de muestras positivas en PCR en tiempo real, mientras que por la técnica de Sheather – coloración Lugol Dobell O’Connor resultó con el 3.7% de muestras positivas a *Giardia sp.* Se realizó un análisis de datos mediante la prueba estadística t-student y el análisis de varianza ANOVA. El análisis estadístico demostró diferencia significativa de la presencia de *Cryptosporidium parvum* entre el periodo de ausencia y presencia de lluvias; sin embargo demostró que no existe diferencia significativa entre los puntos de muestreo seleccionados. Los resultados de este estudio muestran la presencia de *Cryptosporidium sp.*, y *Giardia sp.*, que deben ser tomados en cuenta para el tratamiento de estas aguas destinadas al consumo humano, lo cual puede generar riesgo sanitario.

## INTRODUCCIÓN

*Cryptosporidium sp.*, es un protozoo que pertenece al subphylum Apicomplexa, considerado un patógeno intracelular de animales y humanos globalmente importante (1). Sus ooquistes poseen elevada resistencia a los tratamientos comunes de potabilización, ya que se requiere una concentración mayor de 80 mg/L de cloro libre para su destrucción. Esto es 400 veces la máxima concentración recomendada en agua para consumo humano (2).

*Giardia sp.*, es otro protozoo que pertenece al phylum Metamonada, que se presenta en aguas naturales no tratadas; producto de la contaminación fecal (3). La giardiasis es considerada una infección re-emergente debido su creciente frecuencia y eficiente transmisión a través reservorios animales, humanos, y ambientales (aguas polucionadas) (4).

*Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.* son protozoarios de importancia en la salud pública debido que estos organismos poseen una estructura quística que los rodea y los protege de ciertas condiciones ambientales, los hace resistentes a la desecación, a la carencia de nutrientes, altas temperaturas, escasez de oxígeno, a la respuesta inmune del huésped y a la desinfección en plantas de tratamiento de agua potable y aguas residuales (5).

Las principales formas de transmisión son la vía fecal-oral, el consumo de agua contaminada, consumo de alimentos regados con agua sin tratar (5). La mayoría de infecciones gastrointestinales son atribuibles a la contaminación del ambiente, en este aspecto, el agua y los alimentos juegan un papel importante (6). Estudios en países desarrollados indican que la mayoría de las aguas superficiales tienen contaminación parasitaria que debe ser considerada en los procesos de tratamiento y desinfección de agua para el consumo humano (7).

En Latinoamérica se han realizado estudios que reportan la concentración de estos protozoos en aguas superficiales lagos, lagunas y ríos. En Argentina se encuentran promedios entre 1 a 16 quistes de *Giardia sp.*, por litro de agua y de 1 a 24 ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, por litro, en Brasil se han



reportado de 33 a 95 quistes de *Giardia sp.* por litro y de 44 a 100 ooquistes de *Cryptosporidium sp.* por litro (5).

La contaminación de aguas superficiales es un problema que afecta a países desarrollados y en vías de desarrollo (7). Por lo tanto, las fuentes superficiales de agua para consumo humano deben ser monitoreadas periódicamente desde su punto de origen. Piuray, abastece al 29% de la población del cercado de la ciudad del Cusco y parte del distrito de San Sebastián, aportando al sistema de agua potable el 44.7% de la producción total del agua (8), cuyos efluentes para redes públicas son tratados por la Empresa Prestadora de Servicios de Saneamiento EPS SEDACUSCO S. A.

Reconociendo que *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.* son de importancia en la salud pública para los humanos e indicadores de la calidad de agua, son los motivos que nos llevaron a realizar el presente trabajo de investigación.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio C - 224 de la Escuela Profesional de Biología - Facultad de Ciencias- Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco y el laboratorio del área de Biología Molecular del Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia durante ocho meses (Julio 2015 a Febrero 2016), dónde se evaluó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium sp.* y quistes de *Giardia sp.* mediante las técnicas de certeza parasitológica: Sheather – coloración Kinyoun, Sheather – Lugol parasitológico Dobell & O’connor y la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

El cuerpo léntico de Piuray es una de las fuentes del sistema de abastecimiento de la Empresa Prestadora de Servicios SEDACUSCO S.A. que brinda agua potable al 29% de la población atendida de la ciudad del Cusco, especialmente a la zona del Casco Monumental (8). Este cuerpo léntico es considerado oligotrófico por su baja producción de biomasa (9); pero se encuentra expuesta a diferentes factores que podrían alterar su composición y naturaleza. Entre ellos están los desechos animales, humanos, pesticidas, fertilizantes, y residuos sólidos producto de la acción antrópica del entorno. Mediante observaciones realizadas *in situ*; este cuerpo léntico no presenta protección alguna, siendo utilizada por la población animal y humana del entorno, existiendo un contacto directo entre hospederos y el agua, lo que pone a este recurso hídrico en riesgo parasitológico pudiendo estar *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.*, evaluados en el presente estudio por técnica directa y PCR en tiempo real, efectuado en 10 puntos seleccionados durante el periodo Julio del 2015 a Febrero del 2016, para responder a la interrogante de investigación siguiente.

¿Cuál será el resultado de la evaluación de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.* en el cuerpo léntico de Piuray por Pruebas de Certeza Parasitológica y PCR en tiempo real?

## JUSTIFICACIÓN

El agua es un importante medio de transmisión y dispersión para ooquistes de *Cryptosporidium sp.* y quistes de *Giardia sp.*, que son resistentes a tratamientos comunes de potabilización en los que se requiere, como mínimo, una concentración de 80 mg/L de cloro libre para la inactivación de ooquistes, siendo 400 veces la máxima concentración permitida en el agua para consumo humano (2).

La Criptosporidiosis y Giardiosis al igual que otras enteroparasitosis, contribuyen a elevar el índice de desnutrición infantil, producen alteraciones en el crecimiento, interferencias con la absorción de nutrientes, cuadros de anemia, pérdida de energía y letargo, lo que disminuye la capacidad de trabajo y la productividad, generando un deterioro de la calidad de vida en la población (10).

Evaluando ello, y tomando en cuenta el Reglamento de la Calidad de Agua para el consumo Humano del 2011, la Legislación Medio Ambiental D.S.N° 002-2008-MINAM del 2008 (11) y D.S.N° 015-2015-MINAM del 2015 (12) que en sus artículos respectivos, proponen la evaluación de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.*, asignados como “patógenos emergentes” por la CDC de Atlanta (13); importancia en la que reside el presente estudio, dónde se evaluó a estos patógenos en el cuerpo léntico de Piuray, considerando la sensibilidad, especificidad y eficiencia de la PCR en tiempo real para el diagnóstico de éstos agentes nosológicos, ya que influye en la calidad de vida del poblador; no habiendo además, precedente bibliográfico sobre el tema en el área de estudio propuesto.

Por las razones mencionadas anteriormente, y siendo *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.*, indicadores de la calidad del agua, es necesario entonces establecer como factores de riesgo a los protozoarios citados, ya que en los tratamientos de potabilización tradicionales no son eliminados y cuyos resultados servirán para asumir medidas preventivas y de control (14).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Evaluar *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.* en el cuerpo léntico de Piuray por pruebas de certeza parasitológica y PCR en tiempo real.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar *Cryptosporidium sp.* por la técnica de Sheather - coloración Kinyoun.
2. Determinar *Giardia sp.* por la técnica de Sheather – Lugol parasitológico Dobell & O’connor.
3. Extraer ADN de las muestras obtenidas del cuerpo léntico de Piuray
4. Estandarizar la PCR en tiempo real y aplicarla para el diagnóstico de ambos agentes nosológicos.
5. Evaluar la presencia de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.* en los meses de ausencia y presencia de lluvias mediante la diferencia significativa de los promedios obtenidos.
6. Evaluar la presencia de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.* entre los puntos de muestreo mediante la diferencia significativa de los promedios obtenidos.

### **HIPÓTESIS:**

Las pruebas de certeza parasitológica y la PCR en tiempo real, determinan *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.*, en muestras obtenidas del cuerpo léntico de Piuray.

### **VARIABLES:**

#### a. INDEPENDIENTES:

Lugar de colección de muestra.

Mes de colección de la muestra.

#### b. DEPENDIENTES:

Número de ooquistes y/o quistes de *Cryptosporidium sp.*, y *Giardia sp.*

DNA amplificado por PCR en tiempo real de *Cryptosporidium sp.*, y *Giardia sp.*

## CAPITULO I - MARCO TEÓRICO

### 1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES.

**Rochelle P, et al. California, EE.UU (1997).** Determinaron que la sensibilidad de detección de la PCR aplicado varió entre 5 a 50 ooquistes de *Cryptosporidium sp.* y quistes de *Giardia sp.* en muestras de agua del medio ambiente en California. Utilizaron *PCR Multiplex* para la detección simultánea de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.*, demostrando la utilidad potencial de PCR para la detección de protozoos patógenos en el agua (15).

**APHA. New York, (2000).** En su estudio, “*Drinking Water Quality and Public Health*” propuso que el protozoo entérico más importante es *Cryptosporidium parvum*, parásito que se vehiculiza en el suministro de agua potable y puede causar brotes graves de enfermedades gastrointestinales; además es considerado una amenaza importante, debido a que es altamente infeccioso, resistente al cloro, y debido a su pequeño tamaño hace que sea fácil de filtrar en sistemas de tratamiento de agua moderna y bien operada (16).

**Abramovich B, et al. Argentina (2001).** Determinaron los niveles de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.* en un cuerpo de agua superficial destinado como fuente de agua potable y de recreo. Estimaron la relación con los parámetros bacteriológicos y físico-químicos, durante 22 meses; en las provincias de Santa Fe y Santo Tome, encontraron *Cryptosporidium sp.* en el 100 % de las muestras de agua destinadas para recreación y de 92 % en las fuentes de agua superficiales, mientras que *Giardia sp.* se encontró en concentraciones más bajas al 72 % y 31% respectivamente, encontrándose relaciones significativas entre estos parásitos y materia orgánica, turbidez y los indicadores de contaminación, sin embargo, varían de acuerdo al lugar de muestreo, la fuente y los niveles de contaminación (17).

**Luna S, et al. Costa Rica, (2002).** Determinaron *Cryptosporidium sp.* en el análisis de 400 L de un total de 14 puntos de muestreo de la planta de tratamiento del Instituto Nacional de Acueductos y Alcantarillados de Costa Rica, mediante la técnica de filtración de membrana y la técnica de coloración de Koster modificada. Seis de las siete muestras de agua sin tratar (85,7%) y cuatro de las siete de agua tratada (57%) presentaron ooquistes de *Cryptosporidium sp* (18).

**Díaz M, et al. México, (2003).** Realizaron muestreos en 14 tanques de almacenamiento, analizando aproximadamente 1000 L de agua, utilizando filtros de polipropileno y filtros de nitrocelulosa; aplicaron la técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, reportando presencia de 0 a 5 ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, en la mayoría de muestreos, además afirmaron que a pesar de que el cloro reduce las bacterias coliformes, su empleo resulta ineficiente para matar ooquistes y quistes de parásitos necesitando más de 80 mg/L de cloro para eliminar los ooquistes de *Cryptosporidium sp* (2).

**Alarcón M, et al. Colombia, (2005).** Evaluaron la presencia de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.* en cinco puntos de muestreo del Río Bogotá; analizando aproximadamente 4000 L. Reportaron *Giardia sp.* en los dos puntos de aguas potabilizadoras, pero no en el río Bogotá. Y positiva para *Cryptosporidium sp.* en una muestra proveniente del río, y negativa para las muestras de agua potable (5).

**Grupo de Investigación GEPAMOL de la Universidad del Quindío. Montenegro, Colombia (2012):** Mediante el análisis de 38 muestras, determinaron la viabilidad y la frecuencia de los quistes de *Giardia s.*, *Blastocystis sp.* y ooquistes de *Cryptosporidium sp.* en agua potable y no potable de la provincia de Sonora, mediante técnicas de certeza parasitológica, inmunología y PCR. Por PCR con pruebas genotipo específicas, se encontró que el 38% de muestras de agua no potable y el 20% de las de agua potable fueron positivas para *C. parvum*; el 5,5% de agua no potable y el 5% de las de potable fueron positivas para *Giardia sp.* y en agua potable 5% eran positivas a *Blastocystis sp.*, no presentando este parásito las de agua no potable (19).

**Bajer A, et al. Polonia (2012).** Realizaron un estudio para comparar la contaminación de aguas superficiales y aguas tratadas para la potabilización, del periodo del 2008 a 2009; utilizando inmunofluorescencia y PCR, encontrando *Cryptosporidium sp.* en el 85 % de las muestras de aguas superficiales y 16% en las muestras de aguas tratadas; además se observaron quistes de *Giardia sp.* en el 61% de las muestras de agua superficial y el 19% en el agua tratada (20).

**Thulasi Kumar, et al. Malasia (2013).** Entre abril y octubre de 2013, analizaron muestras de aguas tratadas y no tratadas de los países de Malasia (53 muestras), Tailandia (120 muestras), Filipinas (33 muestras), y Vietnam (15 muestras). Se detectaron 0.19 ooquistes/L de *Cryptosporidium sp.* en muestras de agua tratada de las Filipinas; y 1.41 ooquistes/L de *Cryptosporidium sp.* en muestras de agua sin tratar de Tailandia, Malasia, y Filipinas además, detectaron 0.06 quistes/L de *Giardia sp.* en las muestras de agua tratada de las Filipinas, y 19.65 quistes/L de *Giardia sp.* en muestras de agua sin tratar de Tailandia, Vietnam, Malasia, y Filipinas. *C. parvum* y *G. lamblia* se confirmaron por PCR en tiempo real. (21).

**Adamska M. Polonia. (2015).** Genotipificó y realizó un análisis filogenético sobre las bases de ADN ribosomal 18S y los genes de las secuencias SS-Giardin de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.*, respectivamente; con el fin de proporcionar la caracterización molecular de estos parásitos detectados anteriormente en cinco cuerpos naturales de agua en Polonia, además, realizaron un seguimiento de las posibles fuentes de contaminación por ooquistes y quistes, el genotipado reveló una alta similitud (más del 99%) de secuencias analizadas al genotipo de *C. parvum* aislado a partir de heces de ganado bovino y humano y de *Giardia sp.* que fue aislada de heces de humano. Llegando a concluir que la contaminación de los tres lagos examinados es probablemente de origen humano (heces); mientras que las fuentes de contaminación de los dos lagos restantes son debido a las excretas de animales salvajes y domésticos (22).



**Medeiros R. C, Daniel L. A., Brasil (2015).** Aplicaron los métodos de triple centrifugación y filtración con membrana para recuperar el número máximo de ooquistes y quistes de muestras de aguas residuales en la ciudad de Rió Grande do Sul, utilizando ColorSeed (R), y separación inmunomagnética para la captura de ooquistes principalmente en muestras de agua con turbidez media y baja. La triple centrifugación alcanzó tasas de recuperación de 85% y 20% para los quistes de *Giardia sp.* y ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, respectivamente. Para muestras de agua de baja turbidez del efluente fueron tratados por filtración con membrana recuperando el 67,5 % para los quistes de *Giardia sp.* y el 22,5 % de los ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, concluyendo que los métodos simples, rápidos y de bajo costo no implican tanto la manipulación de las muestras y podría ser útil, sobre tdo en países en vías de desarrollo (23).

## **1.2. ANTECEDENTES NACIONALES.**

**Pérez G. Trujillo, (2008).** Realizó un estudio para la detección de parásitos intestinales en agua y alimentos en la ciudad de Trujillo, para las muestras de agua utilizaron 20 L por punto de muestreo, una bomba de aspiración portátil y filtros de acetato de celulosa, empleando la técnica parasitológica de sedimentación y flotación de Sheather además de las técnicas de coloración Kinyoun y Giemsa; reportando en el análisis lo siguiente: el parásito entérico más prevalente fue *Giardia lamblia* (30%) y los coccidios entéricos más prevalentes fueron: *Cyclospora cayetanensis* (6.5%) y *Cryptosporidium parvum* (3.9%). Indican también que la variación estacional puede afectar a la transmisión de los parásitos intestinales, cuyas formas de resistencia permanecen en condiciones óptimas de temperatura y humedad para mantenerse viables (6).

**DIGESA & MINSA. Lima (2011).** En el Reglamento de la Calidad del Agua para consumo Humano, a través de sus 10 títulos, 81 artículos, 12 disposiciones complementarias, transitorias y finales y 5 anexos; establece límites máximos permisibles, Indicando en el TÍTULO IX Artículo 60°.- intitulado Parámetros Microbiológicos y otros organismos, que: Toda agua destinada para el consumo humano, como se indica en el Anexo I, debe estar exenta de

huevos y larvas de helmintos, quistes y ooquistes de protozoarios patógenos; Bacterias coliformes totales, termotolerantes, *Escherichia coli*, Virus; Organismos de vida libre como: algas, protozoarios, copépedos, rotíferos y nemátodos en todos sus estadios evolutivos (6).

**Ministerio del Ambiente. Lima (2015).** Modifican los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para el Agua y establecen disposiciones complementarias para su aplicación; en la modificación del Artículo N°02 de las disposiciones para la implementación de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para el Agua, se tiene en consideración las siguientes precisiones: En aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable, la concentración de formas parasitarias en aguas potabilizadas tratadas con desinfección debe ser de 0 organismos libres/L; y para aguas potabilizadas con tratamiento convencional y/o avanzado, no debe presentar ningún rango para esta categoría; entendiéndose que debe ser totalmente exenta de protozoarios y organismos de vida libre.

### **1.3. ANTECEDENTES LOCALES.**

**Aurazo M. Cusco, (1998).** Efectuó una visita técnica a solicitud de la EPS SEDACUSCO S.A. realizaron observaciones de campo y muestreo de agua del cuerpo léntico de Piuray, concluyendo que debido a las características de la microcuenca y uso del suelo en el entorno de la laguna se presentan condiciones de riesgo de incorporación de nutrientes al cuerpo de agua indicando además que los factores como la siembra en las zonas inundables alrededor de la laguna, presencia de ganado vacuno y otros domésticos podrían iniciar y/o acelerar el proceso de eutrofización (24).

**Cairo, G. Cusco, (2014).** Evaluó la presencia de protozoos y helmintos en el punto de captación, tributarios del sistema de abastecimiento de agua Jaquira del distrito de Santiago de la ciudad del Cusco, mediante las técnicas de sedimentación compuesta o técnica de Ritchie y la coloración Kinyoun, reportando *Cryptosporidium sp.*, *Cyclospora s.* y larvas de nemátodos (25).

#### **1.4. DESCRIPCIÓN DE *Cryptosporidium* sp.**

##### **1.4.1. POSICIÓN TAXONÓMICA DE *Cryptosporidium* sp.**

Dominio: *Eukarya*. Cavalier–Smith, 1998

Reino: *Protista*. Haeckel, 1866

Subreino: *Biciliata*. Cavalier–Smith, 2002

Infrareino: *Alveolata*. Cavalier–Smith, 2002

Phylum: *Myzozoa* Cavalier–Smith & Chao, 2004

Subphylum: *Apicomplexa*. Levine, 1970 Cavalier–Smith, 2004

Clase: *Conoidasida*. Lueckart, 1879

Subclase: *Coccidiasina*. Lueckart, 1879

Orden: *Eucoccidiorida*. Lueckart, 1879

Suborden: *Eimeriorina*. Cavalier–Smith, 2004

Familia: *Cryptosporidiidae* Tyzer, 1907

Género: *Cryptosporidium*. Tyzer, 1907

Especies: *Cryptosporidium parvum*.

Tyzer, 1912

*Cryptosporidium hominis*.

Morgan-Ryan 2002

##### **1.4.2. MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DE *Cryptosporidium* sp.**

*Cryptosporidium* sp. fue descrito por primera vez en el laboratorio en el año 1907, los primeros casos de criptosporidiosis humana fueron comunicados recién en el año 1976, y sólo se tomó conciencia del organismo a principios de la década del '80 cuando se comenzó a detectar en heces de individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (26).

*Cryptosporidium* sp. es un parásito intracelular que infecta células epiteliales de la luz superficial de los tractos respiratorios y digestivos en una amplia variedad de animales hospederos (26).

#### 1.4.2.1. OOQUISTES.

La forma infectiva y el único estado exógeno de *Cryptosporidium sp.*, corresponde al ooquiste. Éste es esférico u ovoide, mide entre 4,5 y 5,9  $\mu\text{m}$  de diámetro y contiene en su interior 4 esporozoítos periféricos y un cuerpo residual central (19). En el caso particular de *Cryptosporidium parvum*, éste presenta ooquistes casi esféricos de 4 a 6  $\mu\text{m}$  (5,4 x 4,5  $\mu\text{m}$ ) (27).

La pared del ooquiste puede ser de dos tipos: fina o gruesa; lo cual se relaciona con diferentes vías de desarrollo: esporogónico y de infección (27). Existen dos tipos de ooquistes, el primero de pared gruesa, es responsable de la transmisión de un reservorio a otro y el segundo de pared delgada, es responsable de un ciclo de autoinfección en el hospedador infectado, a través del reciclaje continuo de los esporozoítos que salen de los ooquistes (28).

La capa externa (5  $\eta\text{m}$  de espesor) presenta material filamentosos y glicoproteínas ácidas; que puede ser parcialmente eliminada por efecto del hipoclorito de sodio; ésta se encuentra separada por 5  $\eta\text{m}$  de distancia de una capa central rígida y electrodensa (10  $\eta\text{m}$  de espesor) de composición lipídica y glicoproteíca, lo que le confiere propiedades de ácido-alcohol resistencia. La capa interna, de composición glicoproteíca (20  $\eta\text{m}$  de espesor), provee a la pared rigidez y a la vez elasticidad (29).

La pared del ooquiste, es rica en uniones disulfuro, que permite mantener la capacidad infectiva del parásito. Este parásito se caracteriza por la presencia de una hendidura; estructura longitudinal especializada en la pared del ooquiste a lo largo de la cual, éste se rompe durante la desenquistación (21).

El cuerpo residual presenta elementos esenciales para la supervivencia del parásito. En su interior se encuentran una vacuola lipídica característica, inclusiones proteicas, ribosomas, citomembranas y gránulos de amilopectina, los que proveen nutrición a los esporozoítos. La concentración de amilopectina ha servido como marcador indirecto de la viabilidad, ya que a mayor tiempo y temperatura de conservación, su concentración disminuye (20).

Los ooquistes mantienen su viabilidad a temperaturas entre 4 °C y 22 °C, y sobreviven hasta -20 °C. Temperaturas superiores pueden acelerar su tiempo

de degradación, al igual que los procesos de congelación rápida (30). Los ooquistes tienen una supervivencia de 18 meses en condiciones húmedas y frías, durante los cuales pueden permanecer viables (21).

Los ooquistes son resistentes a los tratamientos comunes de potabilización; ya que se requiere, como mínimo, una concentración de 80 mg/L de cloro libre para disolver la pared ooquistica, siendo ésta 400 veces la máxima concentración permitida en el agua para consumo humano (2), por lo que su hallazgo es utilizado como un indicador de calidad del agua (19).

En estudios realizados, se demostró que los tratamientos de ozonización de aguas, inactiva 99% de los ooquistes de *Cryptosporidium sp.* siendo por ahora, el método más seguro para eliminar esta forma parasitaria del agua destinada para consumo humano (31).



Figura N° 1: Ooquistes de *Cryptosporidium sp.*  
Fuente: Centers for Disease Control and Prevention (CDC de Atlanta), 2015.

#### 1.4.2.2. ESPOROZOITOS.

El esporozoíto es alargado, con forma de coma, con el extremo apical afinado y el posterior redondeado. Los microtúbulos, situados lateralmente por debajo de la membrana plasmática unidos al anillo polar, recorren el cuerpo del esporozoíto desde el ápice hacia su parte media. Ellos permiten su desplazamiento y actúan durante el proceso de invasión (30).

En el extremo anterior del esporozoíto se presenta el complejo apical, compuesto por organelas secretorias (roptrias, micronemas, gránulos densos) y

componentes no vesiculares (conoide y microtúbulos subpeliculares). Los gránulos densos presentan proteínas que se asocian con la vacuola parasitófora o con estructuras vacuolares luego de su exocitosis. En el extremo posterior del esporozoíto se sitúa el núcleo, y próximo a él, se ubica una organela semejante a una mitocondria (26).

Las roptrias y los micronemas le permiten al esporozoíto adherirse e invadir la célula hospedadora e inducirla a envolver al parásito en la vacuola parasitófora. Las roptrias son organelas con forma de maza, cuyo contenido se descarga durante la internalización del parásito (27), en *C. parvum*, una de sus roptrias se extiende hacia el sitio de adhesión y colabora en la transformación de la membrana plasmática de la célula hospedadora en vacuola parasitófora (26); y los micronemas participan en el reconocimiento de la célula hospedadora, su adherencia y motilidad mediada por el receptor: glicoproteína 900 (GP 900) que está presente, y que en los estadios invasivos del parásito se sitúa en la superficie, participando activamente en el proceso de invasión, corroborando las proteínas trombospondinas, que están relacionadas con la motilidad, adherencia e invasión del parásito (27).

#### **1.4.2.3. TROFOZOITO.**

Estado del parásito que contiene un núcleo, éste se divide tres veces y forma una célula octanucleada en unas 16 horas. Cada núcleo migra a la periferie del citoplasma, formando un nuevo estadio; siendo este estadio, el responsable de la diarrea aguda (26).

#### **1.4.2.4. MERONTE TIPO I Y TIPO II.**

Los merontes son estadios del parásito dónde cada núcleo se rodea de membrana plasmática y está compuesto de organelos que sirven para su supervivencia. Los ocho merozoítos se liberan ya completos e infectan por separados a células del huésped adyacentes y repiten el proceso de formación de merontes conocido como merogonia y en tan sólo 24 horas se formará las células más pequeñas conocidas como **meronte tipo II**, que contienen 4 núcleos (27).

#### **1.4.2.5. MEROZOITOS.**

Los merozoítos son producidos por merontes tipo II. Éstos sólo contienen un complejo apical compuesto por anillos preconoidales y micronemas, además de microtúbulos, núcleo y ribosomas; que son utilizados para tomar nutrientes de los enterocitos (27) cuándo son liberados al lúmen del intestino, infectando a nuevas células e iniciando la etapa sexuada de su ciclo biológico (14).

#### **1.4.2.6. MACROCIGOTOS Y MICROCIGOTOS**

Los merozoítos, se convierten en macrocigotos y microcigotos después de 36 a 48 horas de la infección, respectivamente. Los macrocigotos contienen un sólo núcleo, éstos se agrandan y sintetizan numerosos gránulos de amilopectina y cuerpos formadores de pared para transformarse en *macrogametos* (26). Los microcigotos contienen hasta 16 núcleos que migran a la periferia, brotan y adquieren la forma de “bala” y se convierten en *microgametos* (27).

#### **1.4.2.7. MICROGAMETOS Y MACROGAMETOS**

Los microgametos (1.4 x 0.4 µm), contienen un núcleo compacto central y están rodeados de microtúbulos, carecen de flagelos y mitocondrias (14); éste sale de la célula huésped y penetra en otra célula que contiene un macrogameto y se fecundan, formando al ooquiste (27).

#### **1.4.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.**

Para el tratamiento fármaco-químico contra *Cryptosporidium sp.* se han probado más de 200 drogas, tanto *in vivo* como cultivos celulares *in vitro* y ninguna resultó totalmente efectiva en el tratamiento de la infección (19).

Sin embargo, la Nitazoxanida es bien tolerada, con un buen perfil de seguridad. Ha sido aprobada por la “Food and Drug Administration” para el tratamiento de los pacientes inmunocompetentes. En un ensayo clínico aleatorizado y controlado de los niños de Zambia enfermos de criptosporidiosis y VIH negativos, la administración de 100 mg de nitazoxanida, 2 veces/día, resultó en una mejora estadísticamente significativa de la diarrea y la eliminación del parásito (29).

Los medicamentos que se han utilizado para tratar la infección por *Cryptosporidium sp.* incluyen: paromomicina, espiamicina, la azitromicina y la

claritromicina, todos de actividad antiparasitaria. Un estudio abierto, de paromomicina en pacientes VIH positivos con criptosporidiosis comprobó que la mayoría respondió clínicamente, pero fue necesario continuar con un tratamiento de mantenimiento continuo para evitar la recaída (29).

#### **1.4.4. CICLO BIOLÓGICO DE *Cryptosporidium* sp.**

El sitio primario de infección de *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* es el intestino delgado. En animales y humanos, este parásito también ha sido encontrado en sitios extraintestinales como vías biliares, hígado, vesícula biliar, páncreas y pulmones (32).

Este protozoario es un parásito monóxeno y heterogenético; monóxeno porque todos los estadios de desarrollo se llevan a cabo en un mismo hospedador (ciclo directo) y heterogenético porque el parásito tiene fases de reproducción asexual y sexual, las que culminan con la formación de un ooquiste que corresponde al elemento infectante de esta parasitosis. La localización del protozoo en el epitelio intestinal, es dentro de una vacuola parasitófora de ubicación intracelular pero extracitoplasmática (33).

Las secuencias de SS ARNr y  $\beta$ -tubulina de los gregarínidos y de *Cryptosporidium* sp. forman un grupo separado del resto del grupo mayor de los Apicomplexas (14); sugiriendo mediante los recientes estudios *in vitro*, que ambos grupos demuestran semejanzas notables entre el ciclo de vida entre *Cryptosporidium* sp. y algunas especies de gregarinas como *Mattesia dispersa*, *M. geminata* y *Gregarina tribolorum*. Al igual que estos protozoos, los esporozoítos de *Cryptosporidium* sp., una vez que salen de los ooquistes, se transforman en trofozoítos que se agrupan formando los merontes tipo I y II y de estos últimos se originan los merozoítos que iniciarán los estadios sexuales (20). El período de prepatencia varía con el hospedador, la especie de *Cryptosporidium* sp. involucrada y la dosis infectiva. En terneros, se estableció un período de prepatencia de 2 a 7 días, mientras que en el humano tiene una duración de 4 a 22 días, según se trate de individuos inmunocompetentes o inmunosuprimidos. El período de patencia (eliminación de ooquistes) tiene una duración de 1 a 12 días en terneros, y de entre 1 y 20 días en humanos (26). Los requerimientos necesarios para iniciar el desenquistamiento incluyen



cambios en la temperatura y el pH, sales biliares y acción de proteasas. El contacto directo entre los ooquistes y el ácido siálico presente en la superficie de las células intestinales también constituye un estímulo para el desenquistamiento (14).

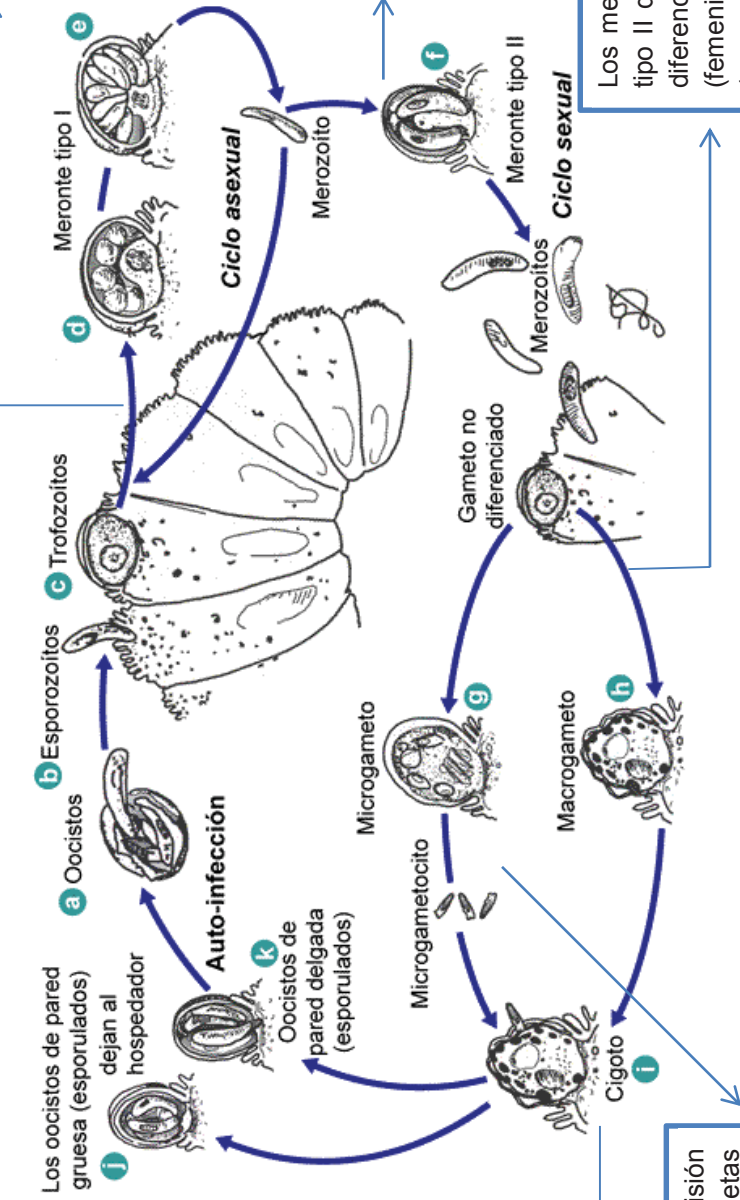
La apertura de la pared del ooquiste a lo largo de una línea de sutura; libera a los cuatro esporozoítos. El desenquistamiento es un proceso que se cumple exclusivamente en parásitos metabólicamente activos y que involucra la acción de enzimas parasitarias (61)

Los esporozoítos liberados son móviles e invaden la célula hospedadora. El extremo anterior de cada esporozoíto se adhiere a través del antígeno a un receptor presente en las microvellosidades intestinales. Durante la interacción con el enterocito, las proteínas de superficie del esporozoíto y las proteínas secretadas por las organelas especializadas del complejo apical facilitan la adhesión y la invasión, y estimulan la formación de la vacuola parasitófora; formándose el trofozoíto. (61,49)

El trofozoito se divide tres veces hasta formar una célula octonucleada, donde cada núcleo migra al citoplasma y se forman los merontes tipo 1. (61)

Luego de la ruptura del meronte, los merozoítos liberados ingresan en una nueva célula epitelial adyacente (**ciclo asexual**) y desarrollan en su interior un meronte tipo I (con 8 merozoítos) o tipo II (con 4 merozoítos). (49)

Los merozoítos liberados por el meronte tipo II que parasitan nuevas células y se diferencian en macrogametocito (femenino) y microgametocito (masculino). El macrogameto evoluciona a un macrogameto femenino, inmóvil y uninucleado y permanece en el interior del enterocito. (49)



Luego de la fecundación del microgameto masculino con la macrogameta femenina se origina el huevo o cigoto (**ciclo sexual**); que es el único estado diploide del ciclo, dará al lugar al ooquiste después de adquirir la pared quística. Éste se libera finalmente del enterocito y es eliminado al medio ambiente. El 20% de los ooquistes producidos sufren una falla en la formación de la pared y se denominan ooquistes de pared fina. Éstos liberan los esporozoítos en la luz intestinal y pueden ingresar en nuevos enterocitos. (49)

El microgametocito se multiplica por fisión múltiple y origina 16 microgametas masculinas móviles que abandonan la célula parasitada en busca de la macrogameta. (61)

Figura N° 2: Ciclo Biológico de *Cryptosporidium* sp.

Fuente: CDC de Atlanta, 2015

#### **1.4.4. EFECTOS EN EL HOSPEDADOR**

La criptosporidiosis, causa infecciones gastrointestinales caracterizadas por una diarrea tipo acuosa, que si demora más de 14 días es considerada una diarrea persistente. Cada vez hay más evidencia de que entre las especies y los genotipos patógenos para los humanos, la virulencia y las manifestaciones clínicas pueden ser diferente; el periodo de incubación de la criptosporidiasis puede variar en 3 a 14 días y parece ser independiente a la cantidad de ooquistes ingeridos (14).

*Cryptosporidium sp.* parasita la superficie apical de la célula hospedadora, durante la interacción con el enterocito; las proteínas de superficie del esporozoíto y las proteínas secretadas por las organelas especializadas del complejo apical facilitan la adhesión y la invasión, y estimulan la formación de la vacuola parasitófora; y ante la presencia de ésta, las células regulan el aumento de su tamaño a través de la modificación de la permeabilidad de la membrana al agua y a ciertos iones (26). Provoca citólisis al multiplicarse, siendo el sitio principal de la infección el intestino delgado, aunque puede propagarse a través del tracto gastrointestinal (27).

Los diferentes estadios parasitarios desplazan el borde de las microvellosidades y, eventualmente, llevan a la pérdida de la superficie intestinal. Se reduce el tamaño de las vellosidades y las criptas intestinales aumentan de longitud por la aceleración de la división celular a fin de compensar la muerte celular (14). Entre las 6 y las 24 horas de la pos-infección predomina un efecto antiapoptótico; a las 24-48 horas de la pos-infección se hacen más evidentes las señales pro-apoptóticas, lo cual permite que el parásito complete su ciclo de vida (24-48 horas) antes de que la célula hospedadora entre en apoptosis (26).

Se ha descrito aumento de sacaridasas y disminución de lactasas en el epitelio intestinal (26). La mala absorción 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 que dan lugar a diarreas acuosas y cólicos abdominales, vómitos, fiebres y anorexia (14).

Se desconoce aún la puerta de entrada a las vías respiratorias; en las aves se transmite por inhalación, por lo cual en el ser humano no podría excluirse esa entrada, aunque la forma de contaminación a tejido respiratorios, en la mayoría de casos fue por aspiración gastrointestinal en individuos inmunocomprometidos (27).

#### **1.4.5. EPIDEMIOLOGÍA.**

Las especies del género *Cryptosporidium* son de distribución cosmopolita. El principal mecanismo de infección es la ingestión de ooquistes por contacto directo o indirecto con el hospedador. Este género presenta características epidemiológicas particulares: la dosis infectiva es baja (1 a 10 ooquistes), los ooquistes no requieren maduración exógena una vez eliminados, presentan notable resistencia frente a condiciones adversas y se dispersan en el ambiente con la consecuente contaminación del agua destinada al consumo humano (34).

La criptosporidiosis es un problema de salud pública, con una prevalencia variable en función a las características culturales y económicas de una población. Es más frecuente en lugares con problemas de infraestructura en las canalizaciones de agua potable, aguas superficiales, recreacionales (ríos, lagos, lagunas y piscinas) y en contacto estrecho con animales (14).

En los últimos años, los brotes de *Cryptosporidium sp.* transmitidos por el agua superficial afectaron a más de 100 000 personas (14). A nivel mundial, se han informado más de 45 brotes de criptosporidiosis transmitidos por el agua en las últimas décadas, y los países más afectados fueron los Estados Unidos y el Reino Unido (35). El brote de criptosporidiosis ocurrido en el año 1993 en Milwaukee, Estados Unidos, ha sido reconocido como uno de los brotes más importantes relacionados con el consumo de agua contaminada. Éste afectó a 400 000 personas, entre las cuales se encontraban hospedadores inmunocomprometidos que desencadenaron formas graves de la infección (26).

La prevalencia estimada de *Cryptosporidium sp.* en personas con diarrea es de 1 a 3% en países desarrollados y de aproximadamente el 10% en países en vías de desarrollo. En niños con diarrea, se ha evidenciado en 7% de los casos en los países desarrollados y en una proporción mayor a 12% en países en

vías de desarrollo; en éstos últimos es difícil estimar la prevalencia debido a que la infección no es de notificación obligatoria y los datos epidemiológicos son escasos (14).

La distribución de *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* en humanos difiere de acuerdo a las regiones geográficas: *C. hominis* tiene una prevalencia del 62% en países de América del Norte, Australia y África; mientras que *C. parvum* prevalece en Medio Oriente y América del Sur; y en países en vía de desarrollo. En Europa se encuentra una distribución igualitaria de ambas especies, pero en la mayoría de países a nivel mundial, *C. parvum* prevalece mayormente en el área rural que *C. hominis* (30).

En Brasil se determinó que más de 18.7% de las diarreas en infantes se debían a *C. parvum*; en algunos países latinoamericanos se han establecido cifras de prevalencia así: Argentina: 3.9%; Costa Rica: 4.3%; Venezuela: 10.8%; Ecuador: 11.2%; Guatemala: 13.8%; y 16.7% en Haití. En Colombia se encontró una prevalencia de 83.3% determinada por serología, mientras que por edades se determinó en el grupo de 0 a 14 años una prevalencia de 10.7%, de 15 a 30 años, 20% y en mayores de 30 años, 28.3% (31), siendo la especie más prevalente entre estos individuos : *C. hominis* (57%), seguido de *C. parvum* (23%) (30).

En el Perú son muy pocos los estudios hechos sobre las Enfermedades diarreicas agudas (EDAs) causadas por *Cryptosporidium sp.* En un estudio realizado por la Universidad Peruana Cayetano Heredia en un hospital público de Lima en el año 2004, a través de un estudio caso-control, con 147 pacientes infectados con VIH; el 47% de los casos presentaban infecciones parasitarias que tenían diarrea por más de 7 días; concluyendo que *Cryptosporidium sp.* fue el parásito más frecuente de todos los Coccidios encontrados (36).

#### **1.4.5.1. MEDIDAS PREVENTIVAS.**

En general, el riesgo de infección por *Cryptosporidium sp.* puede reducirse con una higiene correcta de las manos; el lavado de las manos después de una posible contaminación con heces humanas o de animales antes de preparar o consumir alimentos (14). El Centro para el Control y la Prevención de

Enfermedades (CDC de Atlanta), recomienda tomar en cuenta las siguientes medidas:

Un tratamiento adecuado para el agua potable, ya sea para el su consumo o la recreación.

Evitar el consumo de leche no pasteurizada, moluscos marinos y terrestres crudos o insuficientemente cocidos.

En caso de diarreas en niños, evitar el uso de piscinas y guarderías hasta dos semanas después del cese de la diarrea.

En caso de pacientes inmunocomprometidos, evitar la exposición a materia fecal, mantener una adecuada higiene personal durante las actividades.

Otros profesionales, cómo personal de salud o manipuladores de alimentos, no deben asistir a trabajar hasta después de las 48 horas de que ha cesado la diarrea (14).

## **1.5. DESCRIPCIÓN DE *Giardia sp.***

### **1.5.1. POSICIÓN TAXONÓMICA DE *Giardia sp.***

Dominio: *Eukaria*. Cavalie-Smith, 1998

Reino: *Protista*. Haeckel, 1866

Superreino: *Archezoa* Cavalier–Smith, 1998

Infrareino: *Excavata*. Cavalier–Smith, 2003

Phylum: *Metamonada* Grassé, 1952

Clase: *Trepomonadea* Cavalier–Smith, 2013

Orden: *Diplomonadida* Cavalier–Smith, 2013

Suborden: *Giardiina* Cavalier–Smith, 2004

Familia: *Giardiidae* Cavalier–Smith, 2004

Género: *Giardia* Kunster, 1882

Especie: *G. intestinalis (duodenalis, lamblia)*

Boreham y col., 1990

: *G. muris* Filice

: *G. agilis* Filice

Todavía hay debate sobre la clasificación apropiada y la nomenclatura de las especies de *Giardia*, tres grupos relacionados con las variaciones estructurales han sido sugeridos por Filice: *Giardia sp.* **grupo agilis** de los anfibios , el **grupo muris** de los roedores , aves y reptiles y el **grupo intestinalis** en una variedad de mamíferos (incluyendo humanos) (37).

### **1.5.2. MORFOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA DE *Giardia sp.***

Antonie van Leeuwenhoek en 1681 describió parásitos similares a *Giardia*, los cuales observó en sus propias heces, pero el primer informe fue acreditado a Lambl en 1859 (38), actualmente es común usar el nombre de *Giardia lamblia* en honor a Vilem Lambl (1824 – 1895) quien describió el organismo con mayor detalle después que fue visto por primera vez por Leeuwenhoek en 1681, Lambl denominó a este parásito *Cercomonas intestinalis*, pero fue Kunster 1882 quien atribuye el nombre de *Giardia*, y en 1915 Stiles la renombró *Giardia lamblia* (en honor a Lambl), más tarde Filice en 1952 es quien le atribuye el nombre de *Giardia intestinalis (ubicación que infecta)* (39), este nombre es aceptado por la OMS como oficial hasta la actualidad, *Giardia intestinales* también es denominada *Giardia lamblia* o *Giardia duodenalis*.

La infección causada por *Giardia* se presenta en todo el mundo y es uno de los principales parásitos que infecta a niños y ancianos en países en vías de desarrollo (39), la giardiasis no se propaga a través del torrente sanguíneo, ni se extiende a otras partes del tracto gastrointestinal sino, que permanece confinado en el lumen del intestino delgado (39).

*Giardia sp.* es un enteroparásito monoxeno (40); protozoo flagelado anaerobio, aerotolerante, quien es la causa común de diarrea infecciosa causante de la giardiasis y se encuentra entre los 10 principales parásitos reconocidos en humanos, metaboliza la glucosa la cual es su fuente principal de energía transformándola a etanol, acetato y CO<sub>2</sub> (39).

Todas las especies del género muestran una morfología similar (40).

#### **1.5.2.1. TROFOZOITO O FORMA VEGETATIVA.**

Los trofozoito tienen la característica piriforme, con una región dorsal convexa (41), de simetría bilateral con un tamaño que oscila entre 10-20µm de largo y

de 7 -10  $\mu\text{m}$  de ancho (39, 40, 42). Crecen y se multiplican en las porciones más altas del intestino delgado principalmente el duodeno (39).

Presentan dos núcleos simétricos con una masa de cromatina central y diploides, cuatro pares de flagelos que nacen de estructuras denominadas blefaroblastos, estos se designan de acuerdo con su disposición como anterior, posterior, ventral y caudal; tres pares salen de la parte superior y uno (ventral) de la superficie interior encajando detrás del disco suctor en la superficie ventral, estos flagelos son responsables de la motilidad del parásito (39), El disco suctor es una estructura cóncava y bilobulada, de 0,4  $\mu$  de grosor, que ocupa las tres cuartas partes de la superficie ventral del trofozoito (43), es una estructura de soporte, formada por un citoesqueleto de microtúbulos, microfilamentos y estructuras fibrosas asociada al disco ventral de *Giardia sp.*, se ha demostrado que está compuesto de una variedad de proteínas del citoesqueleto, principalmente tubulina (alfa y beta) y subunidades de proteínas estrechamente relacionadas denominadas giardinas (41, 43, 44), que las utiliza para contactar con las células del epitelio intestinal a las que se adhiere (42), además es fundamental para la quimiotaxis y adhesión (39)

Estas dos familias de proteínas, son mejor caracterizadas en el citoesqueleto de *Giardia sp.*: las giardinas, son un grupo de 23 proteínas de estructura alfa-helicoidal y de pesos moleculares entre 29 - 38 kDa, identificadas en las cintas dorsales del disco ventral y las tubulinas, que son proteínas cuya estructura y pesos moleculares son menos conocidos, forman parte de los microtúbulos presentes en el disco ventral, flagelos y cuerpos medianos (43).

Los cuerpos medianos, son colecciones apretadas de microtúbulos y se observan transversalmente en forma de pinza o tenaza sirven de ayuda para la diferenciación de especies sobre bases morfológicas (39), se encuentran en la mitad del cuerpo y son únicos en este género, tienen forma de uña y están formados por microtúbulos que dan soporte al citoesqueleto. Además existen ribosomas, aparato de Golgi y vacuolas periféricas que contiene cistein-proteasas.(42)



Tiene interés señalar la existencia de dos tipos de proteínas de membrana: las proteínas variables de superficie (VSP) y una proteína de shock térmico (HSP) que se comporta como antígeno inmunodominante(42).



**Figura N° 3: Trofozoito de *Giardia intestinalis***  
**Fuente: CDC Giardiasis**

El trofozoito se divide por fisión binaria longitudinal, carece de mitocondria y depende de la adquisición de fosfolípidos, ácidos grasos colesterol, y pirimidinas de su ambiente(39).

El hombre alberga la forma activa o trofozoica de *G. intestinalis*, en su intestino delgado, parte de los trofozoitos no adheridos a la superficie intestinal son arrastrados en el mucus y en los alimentos en digestión (43) . Los trofozoitos tienden a agregarse sobre la pared intestinal y este hecho podría crear una barrera mecánica a la absorción de grasas y vitaminas liposolubles (41).

A medida que la forma vegetativa del parásito avanza distalmente, las condiciones se le hacen más adversas y se inicia el proceso de enquistamiento (43), que es eliminado con las heces llegando al suelo o agua. Estos quistes ingeridos por otra persona dan origen a nuevas formas trofozoicas que repitiendo el proceso asegurando la continuidad del ciclo (40).

### **1.5.2.2. QUISTE O FORMA INFECTIVA.**

Los quistes son de forma ovoide, más pequeños que los trofozoitos, con un tamaño de 8 – 12 µm de largo y de 7 – 10 µm de ancho (39, 40, 42), Se pueden ver entre 2 - 4 núcleos, dos en los quistes inmaduros y cuatro en los maduros situados en uno de sus polos. En su interior presentan restos de estructuras similares a las del trofozoito (42), axonemas flagelares y un cuerpo mediano duplicado y muy curvado.

Los quistes son notablemente estables y pueden sobrevivir durante semanas a meses en el medio ambiente (45), y su carácter fundamental es ser la fase de resistencia, proporcionando protección frente a diferentes grados de calor y frío, además contra la desecación, esta característica es gracias a la gruesa pared quística (39), que es una gruesa cubierta hialina aplicada directamente sobre la membrana plasmática (40), esta capa externa está cubierta de filamentos, quitina, N-acetilgalactosamina y otras proteínas estructurales (42).

Estos quistes no son solamente una forma de resistencia frente a las condiciones adversas del medio externo sino también una forma multiplicativa del parásito, ya que al completar su maduración y una vez duplicados sus estructuras, se forman dos nuevos trofozoitos que emergen del quiste ya totalmente formados, pasada la barrera gástrica llegando al duodeno de su hospedador (40).

Los quistes de *Giardia sp.* son resistentes y pueden sobrevivir en el agua hasta tres meses (10) pero son poco resistente a la desecación o al calor (41), y soportan hasta 3 mg/L de cloro (46).

### **1.5.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO**

Para el tratamiento fármaco-químico de la giardiosis en pacientes sintomáticos, el fármaco de elección para los niños menores de 5 años de edad es la furazolidona debido a que es mejor tolerada, los porcentajes de curación varían del 80% al 100% (39).

Varios fármacos se pueden usar para tratar la infección por *Giardia sp.* Los tratamientos eficaces incluyen metronidazol, tinidazol, y la nitazoxanida. Las alternativas a estos medicamentos incluyen paromomicina y quinacrina. (13).

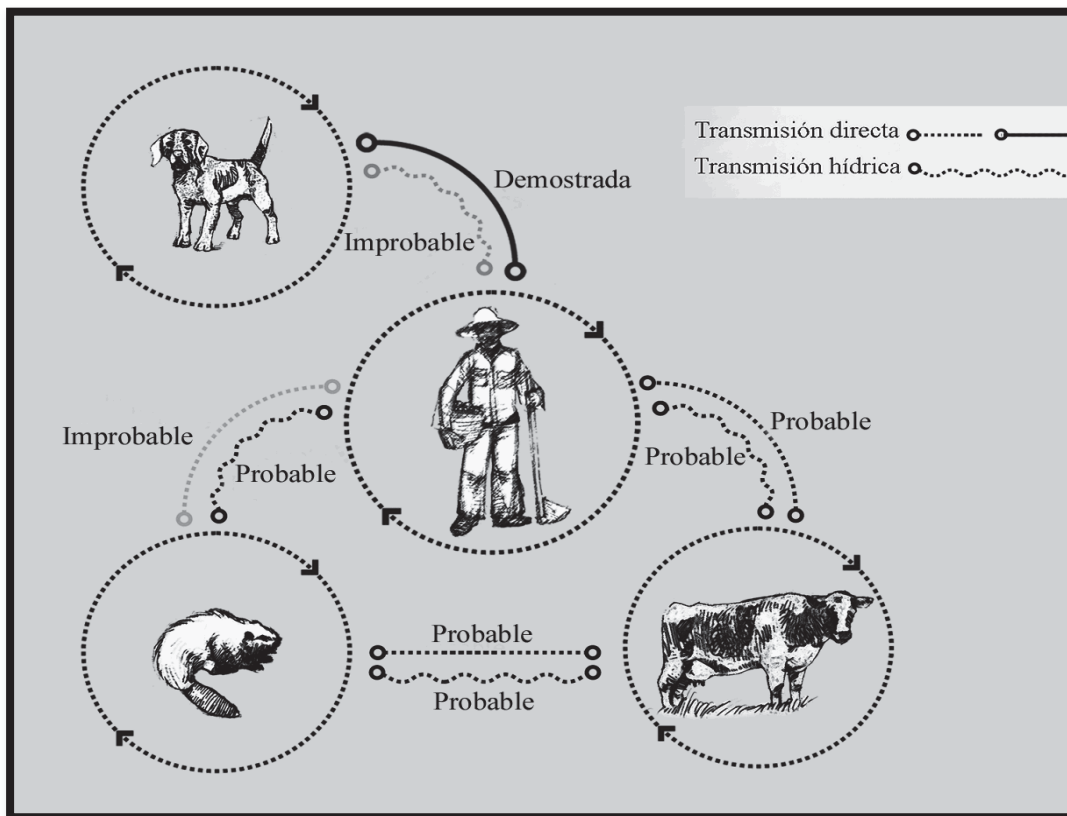
#### **1.5.4. CICLO BIOLÓGICO DE *Giardia sp.***

La carencia de etapas sexuales y de hospederos intermediarios, que sí están presentes en el desarrollo ontogénico de otros parásitos, evidencia la sencillez del ciclo evolutivo de *G. intestinalis*. Básicamente, el ciclo de vida de este microorganismo pasa por solo dos fases: la de quiste, forma infectante, y la de trofozoíto, forma vegetativa. Las condiciones que desencadenan el exquistamiento y el enquistamiento, son probablemente acción de productos de la lipólisis y otras enzimas, aunque aún son objeto de estudio (43).

Presenta 2 etapas: un trofozoito que se multiplica activamente, y un quiste resistente (38).

El ciclo de vida comienza por la ingestión de los quistes latentes en los alimentos o agua contaminada, el exquistamiento se da por la acción de enzimas pancreáticas, tripsina, y quimiotripsina, que terminan por debilitar la pared de los quistes en grado suficiente para liberar dos trofozoitos binucleados en el lumen, los trofozoitos habitan en la luz del intestino adheridos a las vellosidades intestinales por medio del disco suctor, se alimentan y se reproducen por fisión binaria hasta que el contenido intestinal inicia el proceso de deshidratación, momento en el que comienza el enquistamiento. Es así que, a medida que el trofozoito pasa a la porción posterior del tubo digestivo se convierte en una forma quística por acción de la bilis y productos de lipólisis, los quistes son eliminados con las heces llegando al suelo y/o al agua contaminándolos e iniciando nuevamente el ciclo (40). Los quistes tetranucleados, son excretados en forma intermitente en las heces, constituyen la forma infectante del protozoo. Estos quistes son resistentes a condiciones ambientales adversas y pueden permanecer viables por semanas y meses (43).

El ciclo biológico de *Giardia sp.*, se completa cuando el quiste es ingerido por el hospedero correspondiente. En relación con *G. intestinalis* además del hombre, se han descrito varios hospederos y como consecuencia de ello, le atribuyen un gran potencial zoonótico (43). La mayoría de los autores consideran en la actualidad que la giardiosis es una zoonosis ya que existen ciclos de transmisión directa o vehiculada por agua o alimentos entre humanos, animales domésticos y salvajes (42).

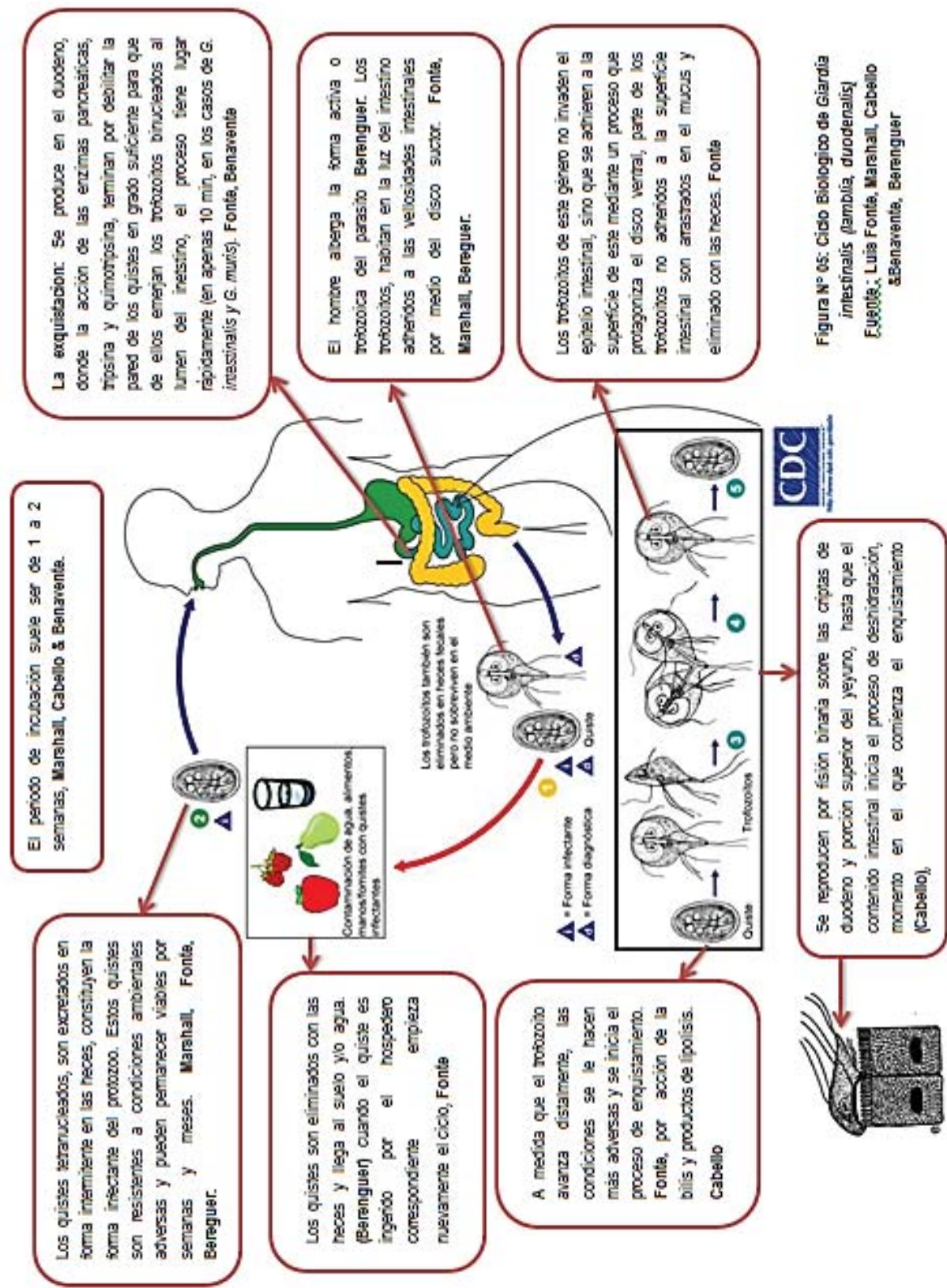


**Figura N° 4: Potencial Zoonótico de *Giardia intestinalis***

**Fuente: Luis Fonte**

Según la racionalización taxonómica propuesta por Filice, *G. intestinalis* podría parasitar además de los humanos, a otras especies de animales domésticos y salvajes. Años después, a este argumento en favor del potencial zoonótico de *G. intestinalis* se sumaría los frecuentes reportes de asociación entre la ocurrencia de brotes de giardiosis por contaminación de las fuentes de agua y la detección de animales infectados por especies próximos a estas. En 1979, ambos argumentos condujeron a la OMS a llamar la atención de la comunidad científica sobre el potencial zoonótico de esta especie (43).

En la siguiente gráfica se muestra el ciclo biológico de *Giardia intestinalis*, el ciclo inicia con la ingesta de aguas y/o alimentos contaminados con quistes de *Giardia sp*, los que ingresan por vía oral hasta que son eliminados por las heces, que por diversos factores llegan a contaminar nuevamente el agua, suelo y alimentos.



El período de incubación suele ser de 1 a 2 semanas, Marshall, Cabello & Benavente.

Los quistes tetranucleados, son excretados en forma intermitente en las heces, constituyen la forma infectante del protozoo. Estos quistes son resistentes a condiciones ambientales adversas y pueden permanecer viables por semanas y meses. Marshall, Fonta, Berenguer.

Los quistes son eliminados con las heces y llega al suelo y/o agua. (Berenguer) cuando el quiste es ingerido por el hospedero correspondiente empieza nuevamente el ciclo, Fonta

A medida que el trofozoito avanza distalmente, las condiciones se le hacen más adversas y se inicia el proceso de enquistamiento. Fonta, por acción de la bilis y productos de lipólisis. Cabello

La exquistación: Se produce en el duodeno, donde la acción de las enzimas pancreáticas, tripsina y quimotripsina, terminan por debilitar la pared de los quistes en grado suficiente para que de ellos emerjan los trofozoitos binucleados al lumen del intestino, el proceso tiene lugar rápidamente (en apenas 10 min, en los casos de *G. intestinalis* y *G. muris*). Fonta, Benavente

El hombre alberga la forma activa o trofozoica del parásito Berenguer. Los trofozoitos, habitan en la luz del intestino adheridos a las vellosidades intestinales por medio del disco suctor. Fonta, Marshall, Berenguer.

Los trofozoitos de este género no invaden el epitelio intestinal, sino que se adhieren a la superficie de este mediante un proceso que protagoniza el disco ventral, parte de los trofozoitos no adheridos a la superficie intestinal son arrastrados en el mucus y eliminado con las heces. Fonta

Se reproducen por fisión binaria sobre las criptas de duodeno y porción superior del yeyuno, hasta que el contenido intestinal inicia el proceso de deshidratación, momento en el que comienza el enquistamiento (Cabello).

Figura N° 05: Ciclo Biológico de *Giardia intestinalis* (*lamblia, duodenalis*) Fuente., Luis Fonta, Marshall, Cabello & Benavente, Berenguer

### **1.5.5. EFECTOS EN EL HOSPEDADOR.**

El período de incubación suele ser de 1 a 2 semanas (38, 39), la infección se produce exclusivamente por la ingestión de quistes, ya sea a través de bebidas o alimentos, ingestión accidental de las aguas recreativas, por contacto directo durante actividades sexuales o la higiene insuficiente (45), Los síntomas gastrointestinales de la giardiosis se caracterizan por su larga duración, frecuentemente se ha observado pérdida de peso importante, debido a la mala absorción de nutrientes por la fijación de los trofozoitos a las vellosidades intestinales, lo cual produce obstrucción y lesión directa de la mucosa intestinal (39).

*Giardia intestinalis* puede ocasionar infección sintomática con una baja cantidad de inóculo aproximadamente de 10 quistes (45, 47), Los trofozoitos se encuentran principalmente en el intestino delgado.

Los dos procesos clave en la patogenia y la fisiopatología de la giardiosis son la adhesión al epitelio intestinal y la lesión del mismo (48), la adhesión al epitelio se da mediante una estructura rígida, que le permite penetrar en la mucosa, este mecanismo de daño es conocido porque el parásito se adhiere firmemente a la pared intestinal; tapando la superficie del epitelio y generando irritación; produciendo así la secreción de moco en la superficie, teniendo una doble obstrucción para la absorción de nutrientes (39), y provocando además una reacción inflamatoria (49).

La giardiosis por lo general comienza con una sensación de malestar intestinal, seguido de náuseas y anorexia, bajo grado de fiebre y escalofríos. Los síntomas posteriores pueden incluir diarrea acuosa, explosiva, con mal olor ya que cuando hay un problema mala absorción, el trabajo de desintegración bacteriano hace que se torne ese olor; también se origina gorgoteo y distensión abdominal asociado con falta de expulsión del gas. También pueden producirse calambres en la parte superior o media de la zona del epigastrio (38). La excreción de los quistes no es permanente ni constante (50).

### **1.5.6. EPIDEMIOLOGIA.**

La giardiosis es una parasitosis de distribución cosmopolita (42, 49), su frecuencia varía de acuerdo al nivel cultural y educativo de la gente, las condiciones sanitarias y climatológicas de cada región (49), es una de las parasitosis más frecuentes en el mundo tanto en países en vías de desarrollo (con una prevalencia entre el 7-20% de la población) como en países industrializados, y con certeza la protozoosis más frecuentemente diagnosticada en países desarrollados (42).

*Giardia intestinalis* es el parásito intestinal más comúnmente aisladas en todo el mundo y es especialmente frecuente en niños de países en vías de desarrollo (38, 45, 47). Su mayor prevalencia se encuentra en zonas tropicales y subtropicales, donde afecta hasta el 30% de los adultos (41). En un estudio reciente para documentar los patrones de parasitismo intestinal en los Estados Unidos, *Giardia intestinalis* fue el parásito más frecuentemente identificado usando microscopía; las tasas de detección para este parásito están entre el 2 y el 5% en los países industrializados y entre el 20 y el 30 % en las naciones en desarrollo. En contraste con la población general, la alta o baja prevalencia se han descrito, y parecen ser más comunes en las zonas urbanas que en las poblaciones rurales(38).

La transmisión por agua tiene lugar en viajeros y en brotes autóctonos relacionados con la contaminación con aguas fecales o deyecciones de animales. Existen tres formas fundamentales de transmisión de la giardiosis: persona - persona, a través de los alimentos y por contacto con agua contaminada. La transmisión interpersonal es la responsable de la elevada prevalencia de esta parasitosis en niños, ancianos, y en hombres homosexuales que practican sexo anal. La transmisión por alimentos se da especialmente en viajeros que no siguen las recomendaciones dietéticas e ingieren alimentos contaminados, crudos o mal cocidos, también al no tener los cuidados higiénicos necesarios antes de consumir los alimentos (42).

Actualmente la giardiosis es considerada una de las parasitosis de mayor frecuencia en el Perú, especialmente en niños, y con una prevalencia que



fluctúa entre 38 a 80%, siendo causa de diarreas, síndrome de malabsorción y desnutrición, entre otros (51).

#### **1.5.6.1. MEDIDAS PREVENTIVAS.**

Según el centro de Control de Prevención de Enfermedades (CDC) se debe tomar en cuenta las siguientes precauciones.

- En general practicar una buena higiene.
- Evitar el agua (potable y recreativa) que pueda estar contaminada.
- En caso de diarreas en niños, evitar el uso de piscinas y guarderías hasta dos semanas después del cese de la diarrea.
- En caso de pacientes inmunocomprometidos, evitar la exposición a materia fecal, mantener una adecuada higiene personal durante las actividades.
- Realizar el lavado de manos después de una posible contaminación con heces humanas, animales, y/o estar en contacto con personas enfermas, etc (13).

#### **1.6. EL AGUA COMO MEDIO DE TRANSMISIÓN DE OOQUISTES Y QUISTES.**

El agua puede ser considerada como un reservorio de patógenos dependiendo de la carga que reciba. Según la Organización Mundial de la Salud, 663 millones de personas se abastecen de fuentes de agua no mejoradas; de ellas, 159 millones dependen de aguas superficiales como lagos y lagunas (52). Así es que, la calidad de agua en un lago está íntimamente ligada con su origen, la existencia de mayor o menor intensidad de mezcla de sus componentes, la estratificación, tiempo de retención, forma física del estanque, los movimientos del agua, los aportes de los contaminantes y su eutrofización (53). Esto se debe principalmente al vertido de los desagües de la población de las zonas rurales, ganado y aves de corral circundante a los cuerpos de agua, que por escorrentía, permite la contaminación fecal en las aguas superficiales (6).

La contaminación de las fuentes de aguas superficiales para el abastecimiento de consumo humano es uno de los problemas más frecuentes en todos los países en vías de desarrollo (6), así la falta de infraestructura sanitaria y la escasez de agua limpia para el consumo de la población son causantes de más de 12 millones de defunciones al año en el mundo; un 60% de la mortalidad de menores de un año está relacionado con enfermedades infecciosas y parasitarias mayormente vinculadas con el agua, ya que el consumo de agua contaminada es responsable de causar enfermedades parasitarias tanto endémicas como epidémicas, agravados por la falta de saneamiento ambiental y desconocimiento de normas higiénicas (52, 54). Es importante considerar que los quistes y ooquistes de parásitos pueden pasar a través de los sistemas convencionales de potabilización y además son resistentes a agentes químicos que se utilizan para el tratamiento de aguas, por lo que no solo se buscará bacterias coliformes totales para presumir contaminación cloacal, debe incluirse análisis parasitológicos para la búsqueda de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.* ya que estos necesitan concentraciones altas de cloro incompatibles con su consumo poniendo en riesgo la salud (31, 54), presentando brotes de diarrea; que en general se relacionan con deficiencias en el tratamiento del agua, operación inadecuada de los sistemas, fallas en los equipos electromecánicos de las plantas o una protección ineficaz de las fuentes de agua. En relación con este último punto, en los países en vías de desarrollo, algunas de las medidas de control ambiental para el flujo de patógenos son precarias o simplemente no existen, haciendo que el escenario de riesgo potencial sea una causa de alarma para la salud de la población. (31).

Los ooquistes de *Cryptosporidium sp.* son excretados en grandes cantidades por los seres humanos y los animales infectados, y por medio de la descarga de residuos, pueden alcanzar el agua superficial (ríos y lagos), sobre todo si existe ganado alrededor y, por consiguiente contaminar el agua potable, ya que debido a su pequeño tamaño pasa los filtros sin ningún problema y son altamente resistentes a los desinfectantes comunes y pueden sobrevivir en el agua durante semanas (55); los últimos estudios concluyen que la forma más segura de eliminar ooquistes de *Cryptosporidium sp.* presente en el agua, es mediante el proceso de ozonización (31).

En el caso de *Giardia sp.* el proceso de multiplicación es tan intenso, que se ha estimado que una deposición diarreica podría contener miles de millones de parásitos, los quistes han demostrado que posee mayor resistencia al tratamiento de potabilización del agua que los indicadores bacterianos de contaminación fecal como coliformes, y otros (38).

Consecuentemente la provisión de agua dulce es un recurso cada vez más restringido y vulnerable, ya que sin agua no existe vida, su escasez y contaminación fragilizan la salud, poniendo en riesgo la vida de millones de personas, causando daños al ecosistema afectando el desarrollo económico, la disponibilidad de alimentos y sumiendo a los habitantes y países subdesarrollados y en desarrollo en un trampa que dificulta su desarrollo físico e intelectual (54).

Por las razones mencionadas anteriormente, la importancia del agua destinada para el consumo humano es una ruta de transmisión para los protozoarios patógenos y es necesario establecer los factores de riesgo del agua superficial destinada a tratamientos de potabilización, con el fin de disminuir el riesgo de epidemias por parásitos (14).

**1.7. LEGISLACIÓN MEDIO AMBIENTAL DS N° 002–2008–MINAM -  
ARTÍCULO 1° “APROBACIÓN DE LOS ESTÁNDARES NACIONALES  
DE CALIDAD AMBIENTAL PARA AGUA”**

**Categoría 1: Población y Recreacional**

Aguas Superficiales destinadas a la producción de agua potable.  
Considera:

A1: Aguas que pueden ser potabilizadoras con desinfección

A2: Aguas que pueden ser potabilizadoras con tratamiento convencional

A3: Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento avanzado (11).

En la siguiente tabla, se muestra los valores máximos permisibles dados por el Ministerio del Ambiente, para agua destinada al consumo humano.

**Tabla N° 1: Estándares de Calidad Ambiental para aguas D.S. N° 002-2008-MINAM**

PARAMETRO MICROBIOLÓGICO	UNIDAD	AGUAS SUPERFICIALES DESTINADAS A LA PRODUCCION DE AGUA POTABLE		
		A1	A2	A3
		VALOR	VALOR	VALOR
Formas Parasitarias	Organismos / Litro	0	0	
<i>Giardia duodenalis (intestinalis)</i>	Organismos / Litro	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Enterococos fecales</i>	NMP/100 ml	0	0	
<i>Escherichia coli</i>	NMP/100 ml	0	0	
<i>Coliformes termo tolerantes</i>	NMP/100 ml	0	2000	20 000
<i>Coliformes totales</i>	NMP/100 ml	50	3000	50 000
<i>Salmonella</i>	Presencia /100 ml	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Vibrio cholerae</i>	Presencia /100 ml	Ausencia	Ausencia	Ausencia

A1: Aguas que pueden ser potabilizadoras con desinfección

A2: Aguas que pueden ser potabilizadoras con tratamiento convencional

A3: Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento avanzado

**Fuente: DS N° 002 – 2008 – MINAM**

## **1.8. LEGISLACIÓN MEDIO AMBIENTAL DS N° 015-2015-MINAM:**

**Decreta:**

**Artículo 1°: “Modificación de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua, aprobados por Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM”**

Modifíquese los parámetros y valores de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para Agua, aprobados por Decreto Supremo N°002-2008-MINAM, detallados en el Anexo de la presente norma.

### **Artículo 2.- ECA para Agua y políticas públicas**

Los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para Agua son de cumplimiento obligatorio en la determinación de los usos de los cuerpos de agua, atendiendo a sus condiciones naturales o niveles de fondo, y en el diseño de normas legales y políticas públicas, de conformidad con lo dispuesto en la Ley N° 28611, Ley General del Ambiente.

## DISPOSICION COMPLEMENTARIA MODIFICATORIA ÚNICA:

Modificación del artículo 2 de las Disposiciones para la implementación de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para Agua.

Modifíquese el artículo 2 de las disposiciones para la implementación de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para Agua, aprobadas por Decreto Supremo N° 023-2009-MINAM, de acuerdo a lo siguiente:

**“Artículo 2.- Precisiones de las Categorías de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (ECA) para Agua:** Para la implementación del Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM y de la presente norma, se tiene en consideración las siguientes precisiones de las Categorías de los ECA para Agua:

**Categoría 1: Poblacional y Recreacional Sub Categoría A. Aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable**

**Tabla N° 2: Modificación de Estándares de calidad ambiental para agua DS N° 015-2015-MINAM**

PARAMETRO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICOS	UNIDAD	AGUAS SUPERFICIALES DESTINADAS A LA PRODUCCION DE AGUA POTABLE		
		A1	A2	A3
		VALOR	VALOR	VALOR
<i>Coliformes totales (35 °C-37°C)</i>	NMP/100 ml	50	5000	50 000
<i>Coliformes termo tolerantes (44,5°C)</i>	NMP/100 ml	20	2000	20 000
<i>Vibrio cholerae</i>	Presencia /100 ml	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	NMP/100 ml	0	**	**
<i>Microcistina-LR</i>	mg/L		0,001	**
<i>Formas Parasitarias</i>	N° Organismos / L	0	**	**
<i>Organismos de vida libre (algas, protozoarios, copépodos, Rotíferos, nematodos, en todos sus estadios evolutivos)</i>	N° Organismos / L	0	<5x10 <sup>6</sup>	<5x10 <sup>6</sup>

A1: Aguas que pueden ser potabilizadoras con desinfección

A2: Aguas que pueden ser potabilizadoras con tratamiento convencional

A3: Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento avanzado

**Fuente: DS N° 015-2015-MINAM**

## **1.9. TÉCNICAS MOLECULARES.**

### **1.9.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (Mullis, Kary; 1985) (56).**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de reacción enzimática *in vitro*, siendo una de las tecnologías más poderosas de la Biología Molecular. Fue desarrollada por primera vez en el año 1985 por el bioquímico estadounidense, Kary Mullis. Por el uso del PCR, las secuencias de ADN específicas dentro de un molde, se pueden copiar o "amplificar" de mil a un millón de veces; la secuencia específica es copiada fielmente; mediante el uso de: primers, ADN polimerasas termoestables y los ciclos térmicos (56, 57).

Teóricamente, el PCR amplifica al ADN de forma exponencial, duplicando el número de moléculas diana con cada ciclo de amplificación. Kary Mullis propone que el número de ciclos y la cantidad de PCR producto final se podrían usar para calcular la cantidad inicial de material genético por comparación con un estándar conocido. Para hacer frente a la necesidad de una cuantificación, se desarrolló la técnica de PCR en tiempo real, la cual se detalla más adelante. Actualmente, la PCR convencional se utiliza sobre todo para otras técnicas de Biología Molecular como: amplificar el ADN específico para una secuenciación o clonación (57, 58).

### **1.9.2. PCR EN TIEMPO REAL(Higuchi *et al*, 1992) POR SYBR GREEN (59).**

El PCR en tiempo real se basa en el principio del método de la PCR clásica desarrollado por Kary Mullis, que detecta ADN a partir de pequeñas cantidades, amplificándolas hasta más de un billón de veces (60). Los primeros que sentaron las bases para desarrollar la PCR en tiempo real fueron Higuchi y colaboradores en 1992, al videograbar en tiempo real la incorporación del bromuro de etidio al ADN durante cada ciclo del PCR realizado bajo la luz UV. Desde entonces, el objetivo de la PCR en tiempo real ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes (57).

Las ventajas de la PCR en tiempo real incluyen:

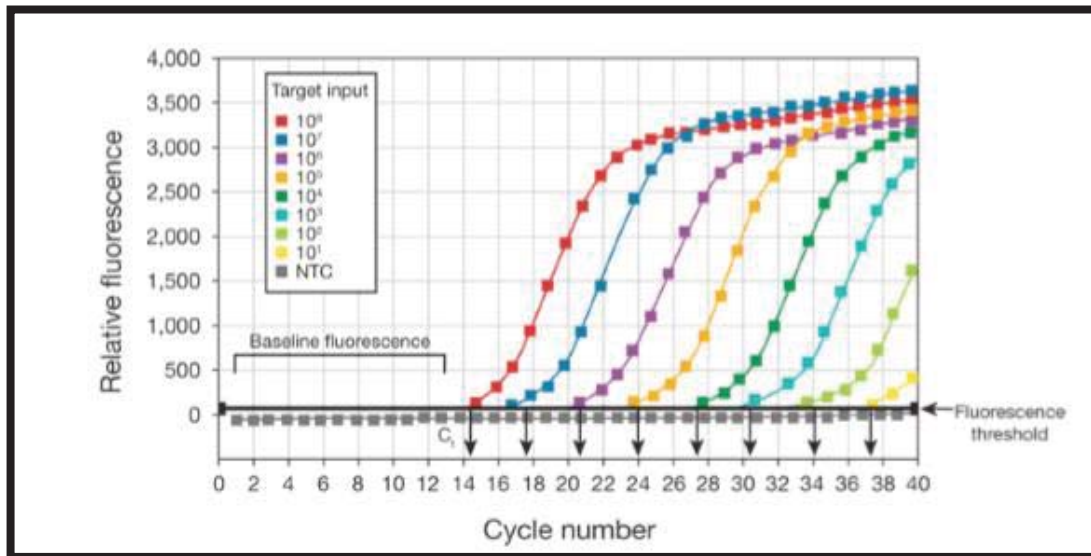
- Capacidad para supervisar el progreso de la reacción PCR ya que se produce en tiempo real (56).

- Capacidad para medir con precisión la cantidad del amplicón en cada ciclo, lo que permite la cuantificación de alta precisión en la cantidad de material genético de partida en las muestras (57).
- La amplificación y detección se produce en un solo tubo, eliminando las manipulaciones posteriores a la PCR, evitando la contaminación del amplicón (61).

Hay tres pasos principales que componen cada ciclo de la PCR en tiempo real. Las reacciones se ejecutan generalmente hasta por 40 ciclos (62), éstas son:

- Denaturación: Este paso es necesario para "separar" el ADN de cadena doble a cadena simple y relajar las estructuras secundarias, este paso se lleva a cabo a 95° C, y por lo general el tiempo de denaturación es de 15 segundos, este tiempo se puede prolongar si el contenido de Guanina y Citocina del ADN diana es alta (56).
- Hibridación o Annealing: Durante esta etapa, los primers o cebadores se alinean por homología frente a su cadena complementaria específica, esta temperatura se calcula en función de la temperatura melting ( $T_m$ ) de los cebadores (  $\pm 5^\circ$  C de la  $T_m$  del cebador); siendo diferente para cada especie de organismos y el cuál es detectado en la curva generada al final de la reacción (62).
- Elongación o Extensión: Esta etapa se da por lo general, entre 70°C a 74°C; dónde la actividad de la ADN Taq Polimerasa es óptima, a medida que se van obteniendo amplicones de doble cadena, el reportero fluorocromo (Syber Green) se va uniendo al ADN para generar una señal fluorescente, que va en aumento dependiendo de la cantidad de muestra inicial y del número de ciclo térmico (56).
- En la PCR en Tiempo Real, la cantidad de ADN presente se mide después de cada ciclo, al término de la elongación por medio de colorantes que producen una señal fluorescente que va en aumento; el cambio en la fluorescencia durante el transcurso de la reacción se mide por un equipo (termociclador) que combina un ciclo térmico con capacidad de escaneo del colorante fluorescente en proporción directa

con el número de moléculas de amplicones generados. Trazando la fluorescencia frente al número de ciclo, el PCR en Tiempo Real genera un gráfico de amplificación que representa la acumulación de producto sobre la duración de toda la reacción PCR como se observa en la figura N° 06 (56).



**Figura N° 6: Gráfico de amplificación que genera el PCR en tiempo real: La fluorescencia emitida en el momento que la sustancia intercalante se une al ADN vs. el número de ciclos.**  
Fuente: (56)

SYBR® Green es un reportero fluorescente utilizado en la reacción del PCR en tiempo real (62), compuesto orgánico de fórmula química  $C_{32}H_{37}N_4S$ , que forma parte del grupo de las cianinas, es un colorante fluorescente que se une al surco menor de todas las moléculas de doble cadena de ADN, independientemente de la secuencia. SYBR® Green presenta un pico de absorción única de luz verde (494 – 521 nm) cuando se une al ADN de doble cadena y es excitado por la luz azul (61). SYBR® Green no se une al ADN de una sola cadena, por lo que la fluorescencia es mínima durante la denaturación (56). Cuando el SYBR® Green se une al ADN de doble cadena, la fluorescencia aumenta significativamente, durante las diferentes etapas de la PCR, la intensidad de esta fluorescencia puede variar, dependiendo de la cantidad de ADN de doble cadena presente (59). Cuando todo el ADN es de doble cadena, la cantidad máxima de SYBR® Green se une y la señal fluorescente está en su punto máximo durante el último ciclo de PCR (56).



## CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.

### 2.1. ÁREA DE ESTUDIO

El cuerpo léntico de Piuray se halla a 3,700 m de altitud, en la Región y departamento del Cusco, provincia de Urubamba, distrito de Chincheros, cuyas aguas están concesionadas a la Empresa Prestadora de Servicios de Agua y Desagüe SEDACUSCO; quienes se responsabilizan del seguimiento analítico fisicoquímico y biológico rutinario, cuyo mapa satelital, se observa a continuación:



Figura N° 7: Mapa satelital de la ubicación geográfica del cuerpo léntico de Piuray.

Fuente: Google Earth.

### LÍMITES:

Limita por el norte con la distrito de Huayllabamba, por el oeste con la provincia de Anta, por el este con la provincia de Calca y por el sur con el distrito de Cachimayo.

La Microcuenca de Piuray cuenta con el afluente de Ccorimarca que pertenece a la Cuenca de Urubamba, que a su vez se integra a la Gran Cuenca del

Amazonas (9), Piuray sirve como fuente de abastecimiento de agua potable a la ciudad del Cusco.

### **2.1.1. CARACTERÍSTICAS GEOMORFOLÓGICAS**

El cuerpo léntico de Piuray se pensaba que correspondía a la edad Neógena, posiblemente Miocena o Pliocena. Sin embargo, la evolución muestra que esta formación corresponde a la Pliocena, debido a que en los alrededores del cuerpo léntico de Piuray se evidencian depósitos palustres y lacustres, compuestos por arcillas intercaladas con diatomitas (63).

La forma es irregular de contornos ligeramente ondulados y con riveras bajas e inundables, con un área superficial de 3.33 Km<sup>2</sup>, cuyo perímetro es de 8750 m, tiene 464.08 m de ancho y 3 000 m de largo, con una profundidad de 20 a 50 m (8, 9, 64).

La capacidad de mezcla en la superficie del cuerpo léntico de Piuray por la mañana presenta vientos de baja velocidad que circulan de norte a sur, notándose un incremento de la velocidad a partir del mediodía con formación de olas de onda corta (64).

Este cuerpo léntico es el colector principal de las escorrentías provenientes de todas las quebradas y del agua generada en numerosos manantes de la microcuenca Ccorimarca - Piuray, además de las acequias que provienen de las poblaciones aledañas (64).

En la zona Sur Oeste se observaron planicies inundables que, en épocas de sequía, son usadas como campo de pastoreo y algunas para cultivos de productos de primera necesidad (64).

### **2.1.2. ACCESIBILIDAD AL LUGAR DE ESTUDIO**

Su acceso es por vía asfaltada, estando a 20 Km en la ruta Cusco-Urubamba y un particular acceso hasta la orilla del cuerpo de agua en mención, por vía afirmada carrozable desde el centro poblado de Alpachaca,

### **2.1.3. FLORA Y FAUNA**

Según estudios hechos por Amésquita, S. en el año 2011, indica que existe vegetación sumergida constituida por *Elodea potamogetum*, *Chara foetida*;

vegetación emergente constituida por *Scirpus totora*, *Thypha angustifolia*, *Hidrocotyle bonariensis*; vegetación flotante constituida por *Azorella filiculoides*; vegetación circundante *Mimutus glabratus*, *Juncus balticus*, *Hordeum vulgare*, *Brassica campestris* (9). Cómo se ha constatado *in situ*, se tiene cultivos de papa (*Solanum tuberosa*) en el área sur-oeste circundante al cuerpo léntico, correspondiente a las comunidades de Cúper Bajo, Caparay, y el punto de Captación de E.P.S. SedaCusco; no hay presencia de vegetación arbórea nativa ni introducida en proximidades del cuerpo de agua, pero si se ha observado la presencia de *Eucalyptus globulus* correspondiente los puntos Ocutuán, Ravilchaca, Sipicuna, y Cuper Bajo más alguna vegetación herbácea principalmente *Pennisetum clandestinum*, que es consumido por la población pecuaria de vacunos, porcinos, y ovinos que suelen pastorear en proximidades del cuerpo de agua.

En estudios realizados por Amésquita, S., en el año 2011, menciona la presencia de Aves, constituidas por *Podiceps rollands chilensis*, *Phlacobaenus melanopterus*, *Tringa melanoleuca*, *Anas puna*, *Bubulcus ibis*, *Chloephaga melanoptera*, *Plegadis ridgwayii*, *Gallinula chloropus*, *Fulica americana peruviana*, *Nycticorax nycticorax hoacctli*; lo que también se constató cuándo se efectuaban los muestreos, habiendo cierta abundancia de aves, también se observó anfibios como *Gastrotheca marsupiata*, además los pobladores indican que hay truchas (*Oncorhynchus mykiis*) que surcan desde los tributarios. Cómo es de esperar, se observaron también insectos entre ellos, la infaltable *Musca doméstica* y presencia de Odonatos.

#### **2.1.4. CLIMA**

Según el SENAMHI, el clima de la Microcuenca de Piuray es Semiseco Frío con Invierno Seco, característico de los valles interandinos; con precipitaciones que empiezan en el mes de noviembre hasta abril y los siguientes meses con una época de precipitaciones escasas (65).

De acuerdo con la clasificación de zonas de vida de Holdridge, que se fundamenta en criterios bioclimáticos como parámetros que definen la composición florística de la zona, en la microcuenca Ccorimarca – Piuray se han identificado dos zonas de vida: Páramo muy húmedo – Subalpino

Subtropical (pmh . Sas) que va desde los 3900m de altitud hasta los 4500 m de altitud, con una temperatura anual máxima de 6.9°C y una temperatura anual mínima de 4.6°C y bosque húmedo – Montano Subtropical (bh – MS), que va desde los 3000 m de altitud hasta los 4000 m de altitud, con una temperatura anual máxima de 9°C y una temperatura anual mínima de 6°C; correspondiendo a bh-MS, la zona de vida para el cuerpo léntico de Piuray (9).

En vista de que la estación meteorológica de Chinchero no se encuentra funcionando desde el año 1999, las condiciones climáticas para el periodo de Julio 2015 a Febrero 2016, según datos del SENAMHI, fueron tomadas de la estación meteorológica de Urubamba.

**Tabla N° 3: Registro de Temperaturas, Precipitaciones y Radicación UV registrados para la zona del cuerpo léntico de Piuray en el periodo de Julio a Diciembre del 2015 a Enero -Febrero del 2016**

	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Precipitaciones (mm / m <sup>2</sup> )	Radiación Ultravioleta
<b>Julio 2015</b>	23.9	3.2	1.61	15**
<b>Agosto 2015</b>	24.4	3.4	5.6	14**
<b>Septiembre 2015</b>	25.17	6.5	2.8	14**
<b>Octubre 2015</b>	25.0**	8.2**	15.2*	15**
<b>Noviembre 2015</b>	25.0**	9.3**	29.5*	15**
<b>Diciembre 2015</b>	23.2**	9.9**	118.5**	14**
<b>Enero 2016</b>	24.4**	10.7*	60.4*	16**
<b>Febrero 2016</b>	23.0**	11.2**	119.0**	15**

\*Valores por lo debajo de lo normal.

\*\*Valores por encima de lo normal.

**Fuente:** Senamhi – Oficina de Estadística, 2016.

### **2.1.5. CLIMATODIAGRAMA DE LA ESTACIÓN METEOROLÓGICA DE URUBAMBA DURANTE EL AÑO 2015**

En la siguiente figura se observa un climatodiagrama con los datos de precipitación pluvial y temperatura obtenidos de la base de datos de la estación meteorológica de Urubamba.

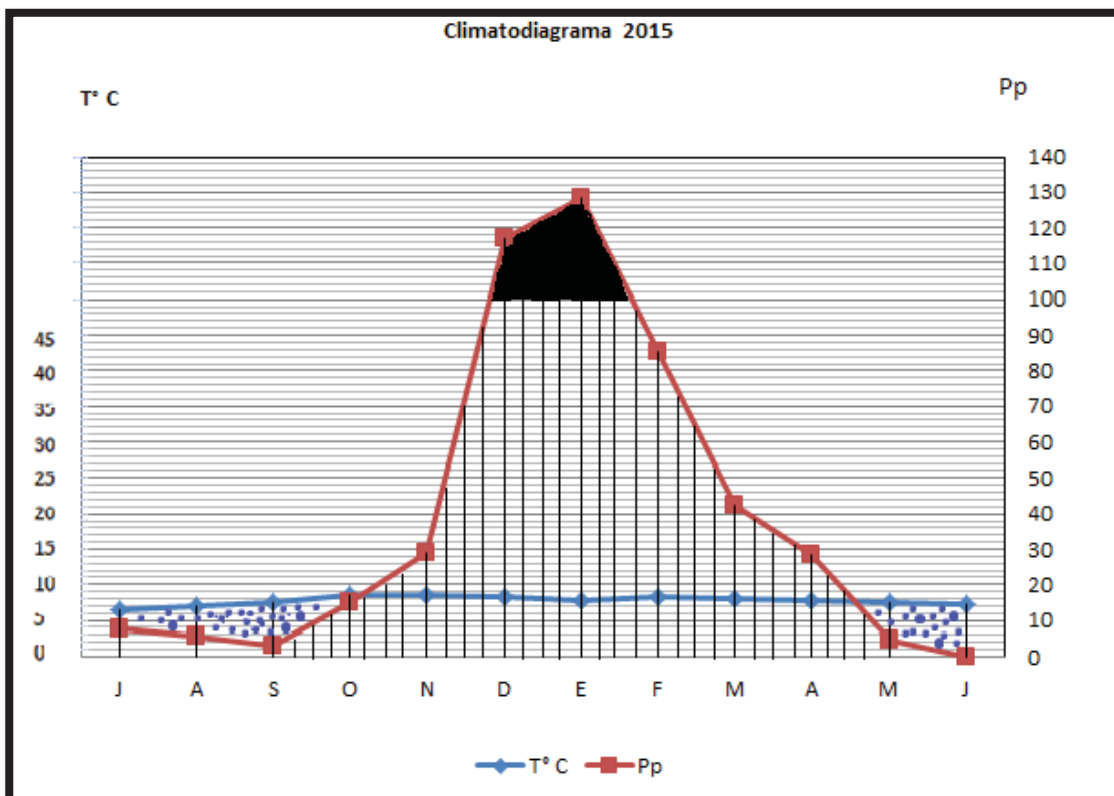


Figura N° 8: Climatodiagrama en base a los resultados obtenidos de la Estación Meteorológica del Senamhi en Urubamba durante el año 2015.

Fuente: Propia, basados en datos de Senamhi

Considerando los datos climatológicos proporcionados por el Senamhi, se tiene que entre Diciembre a Febrero se observa mayores precipitaciones pluviales.

## 2.2. MATERIALES

### 2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

80 muestras de agua del cuerpo léntico de Piuray, tomadas de los 10 puntos de muestreo durante 8 meses (julio 2015 – Febrero 2016).

### 2.2.2. MATERIALES DE CAMPO

- 1 GPS map 76s (GARMIN).
- 1 Cámara fotográfica digital (CANNON REBEL)
- 10 Recipientes de polipropileno de 20 litros.(MARCA REY)
- 1 Cuaderno de datos.
- 1 Mapa de la zona de muestreo.
- 1 Plumón indeleble.

- Lapiceros.

### **2.2.3. MATERIALES PARA PRUEBAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA.**

- Guantes de Latex talla “S” (FAMILY DOCTOR)
- Mandiles descartables (GOLDEN MEDIC)
- Envases de propileno 1L (MARCA REY).
- Tubos de centrifuga de 50 ml (EPPENDORF).
- Pipetas Pasteur 2,5 ml.
- Láminas porta objetos (MICROSCOPE SLIDE).
- Cubre objetos (MICROSCOPE SLIDE)
- Punte coloración para laminas.
- Plumón indeleble.(SHARPIE)
- Detergente (ARIEL)
- Desinfectante en gel (KIMBERLY CLARK).

#### **2.2.3.1. SOLUCIONES PARA PRUEBAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA**

- Solución Sheather – Sugar 33.3% (INS, 2003).
- Lugol Parasitológico Dobbel & O’Connor 3% (REMEL).
- Metanol.
- Batería de Coloración Kinyoun para Coccidios: Fucsina fenicada, alcohol ácido y azul de metileno (REMEL).
- Fórmol al 40%.
- Éter etílico.
- Lejía al 10% (CLOROX).

#### **2.2.3.2. EQUIPOS PARA PRUEBAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA**

- Centrifuga Modelo AG Centrifuga 5810 (EPPENDORF).
- Microscopio Fisher Scientific LED Illumination (LABOMED).
- Refrigeradora de 4°C (BOSCH).

### **2.2.4. MATERIAL DE LABORATORIO PARA PRUEBAS MOLECULARES**

- Guantes nitrilo talla “S” (KIMBERLY CLARK).

- Mandiles descartables (GOLDEN MEDIC).
- Perlas de vidrio Glass Beads X (Kit de Extracción – OMEGA).
- Tubos de centrifuga de 5 ml (EPPENDORF).
- Tubos de microcentrifuga de 2mL libre de ADNAsas (EPPENDORF)
- Pipetas Pasteur 5 ml.
- Micropipetas de precisión de 2.5µl, 20µl, 200µl, 1000µl (Research Plus EPPENDORF).
- Puntas para pipetas libres de nucleasas (MAXIMUM RECOVERY)
- Packs de hielos.
- Placas para PCR plates 96 – well clear (BIO – RAD).
- Sellante Micro Seal B Sel (BIO – RAD).
- Placa Magnética para Mag Bind Soil DNA Kit (OMEGA BIO-TEK).
- Cajas de tecnopor.
- Soporte para tubos de microcentrifuga.
- Paños suaves (KIMBERLY CLARK).

#### **2.2.4.1. MATERIAL BIOLÓGICO PARA PRUEBAS MOLECULARES**

- Muestra de ADN para *Cryptosporidium parvum* (concentración: 5.7 ηg/µl) (Laboratorio de Biología Molecular, Universidad de Texas, EE.UU)
- Muestra de ADN para *Giardia intestinalis* (concentración: 19.4 ηg/µl) (Laboratorio de Biología Molecular, Universidad de Texas, EE.UU)
- Controles negativos de ADN.

#### **2.2.4.2. REACTIVOS PARA PRUEBAS MOLECULARES**

- Kit de Primers para *Cryptosporidium parvum.*: Forward: 5' CTC CAC CAA CTA AGA ACG GCC 3' y Reverse: 5' TAG AGA TTG GAG GTT GTT CCT 3' (Alejandro Castellanos, Laboratorio de Biología Molecular, Universidad de Texas, EE.UU)
- Kit de Primers para *Giardia intestinalis.*: Forward: 5' GAC GGG TCA GGA CAA CGG TT 3' y Reverse: 5' TTG CCA GCG GTG TCC G 3' (Zachary Austin Crannell, Laboratorio de Biología Molecular, Universidad de Texas, EE.UU).

- SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, que contiene: Taq Polimerasa, dNTP's, Mg+, el tampón buffer y el reportero de fluorescencia Sybr Green.
- Agua libre de Nucleasas.
- Kit de Extracción de ADN para suelos MAG BIND SOIL DNA KIT.

#### **2.2.4.3. EQUIPOS PARA PRUEBAS MOLECULARES**

- CFX96 Real Time System C 1000 Touch (BIORAD).
- Ultracongeladora Norma -70°C (THERMOSCIENTIFIC)
- Congeladora -24°C (BOSCH).
- Ultracentrifugadora Modelo Centrifuge 5418 (EPPENDORF).
- Vortex MAXI MIX II (THERMOSCIENTIFIC)
- Espectrofotómetro Nano Drop 2000 (THERMOSCIENTIFIC).
- Incubadoras en seco, Hit Blocks (VWR THERMOSCIENTIFIC).
- Cámara de Bioseguridad tipo II Bio II Advance (TELSTAR).

### **2.3. MÉTODOS.**

La presente investigación corresponde a un estudio descriptivo de corte transversal, en el que se considera 10 puntos muestrales con 8 repeticiones, investigados en el periodo de julio del 2015 a febrero del 2016, totalizando 80 muestras de agua; de 20 litros cada una, correspondientes al cuerpo léntico de Piuray.



### 2.3.1. UNIVERSO MUESTRAL

Agua del cuerpo léntico de Piuray, 10 puntos de muestreo durante 8 meses, que se detallan a continuación en la figura N° 09: Mapa Satelital de los puntos de muestreo y en la posterior tabla N° 04, dónde se detalla los posicionamientos geográficos de los puntos muestreados.

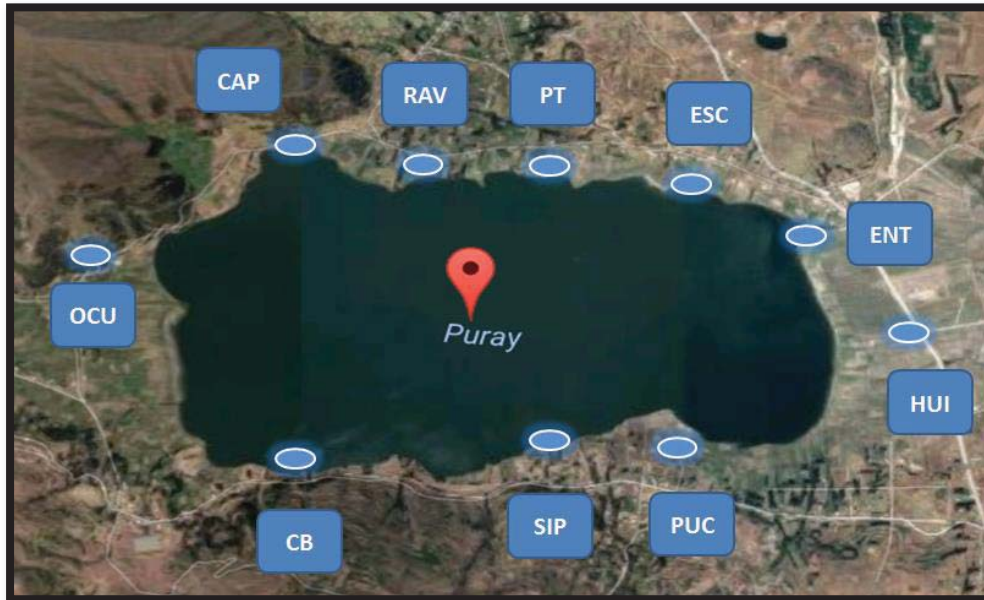


Figura N° 99: Mapa satelital de los puntos de muestreo en el cuerpo léntico de Piuray.

Fuente: Google Earth.

#### 2.3.1.1 PUNTOS DE MUESTREO.

Se seleccionó los puntos de muestro en base a las observaciones realizadas *in situ*, afluentes del cuerpo lentico, características antrópicas del entorno, etc.

- 1) Pucamarca (PUC): Tributario que alimenta al cuerpo léntico de Piuray, al cual desemboca el desagüe de una vivienda, presenta contaminación fecal zoonotica circundante.
- 2) Sipicunapampa (SIP): Desprovista de viviendas circundantes, es usada cómo zona de pastoreo para ganado ovino.
- 3) Cúper Bajo (CB): Zona altamente contaminada, se observó escorrentía de un desagüe de las viviendas circundantes que desembocan directamente al cuerpo léntico de Piuray, además se

observó actividad agrícola circundante con presencia de ganado pecuario.

- 4) Ocutuán (OCU): Tributario del cuerpo léntico, donde hay actividad antrópica cómo aseo personal, recreacional y actividad domestica de la población aledaña.
- 5) Caparay (CAP): Zona del cuerpo léntico de Piuray destinada a la agricultura y pastoreo de ganado pecuario que bebe directamente de la laguna además, se observó la presencia de aves.
- 6) Pongobamba (PT): Tributario que sirve como agua de riego para los diferentes campos de cultivo, y bebedero para el ganado cercano.
- 7) Ravilchaca (RAV): Tributario de agua clara dónde se observó contaminación fecal del ganado circundante sobretodo vacuno.
- 8) Escuela de Pongobamaba (ESC): Zona del cuerpo de agua que en Julio presentó filtración del desagüe del centro educativo, y en los meses posteriores se observó alta eutrofización con presencia de algas indicadoras de contaminación, se observó además aves.
- 9) Entrada de agua para Cusco (ENT): Zona de captación para las redes de la empresa encargada de potabilizar el agua, esta zona se caracteriza por estar cerca al distrito de Pongobamba y presentar viviendas y ganado circundante además de actividad agrícola.
- 10)Huilla – Huilla (HUI): Tributario en el que se observó la presencia sobre todo de ganado porcino, el agua de esta zona es usada directamente por la población y presenta contaminación por residuos sólidos.

En la tabla N° 04 se muestra las coordenadas y altitud de cada punto de muestreo; los cuáles fueron registrados por el GPS para cada fecha de muestreo.

**Tabla N° 4: Posicionamiento geográfico y fechas de muestreo realizadas en el cuerpo léntico de Piuray durante el periodo Julio 2015 a Febrero 2016.**

Punto de Muestreo	Coordenadas UTM	Altitud (m)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
<b>Pucamarca (PUC) (Tributario)</b>	18L: 0820849 UTM: 8515674	3725	21-jul-15	21-ago-15	21-sep-15	21-oct-15	21-nov-15	21-dic-15	21-ene-16	22-feb-16
<b>Sipicunapampa (SIP)</b>	18L: 0821828 UTM: 8515565	3713	21-jul-15	21-ago-15	21-sep-15	21-oct-15	21-nov-15	21-dic-15	21-ene-16	22-feb-16
<b>Cúper Bajo (CB)</b>	18L: 0822382 UTM:8515569	3713	21-jul-15	21-ago-15	21-sep-15	21-oct-15	21-nov-15	21-dic-15	21-ene-16	22-feb-16
<b>Ocutuán (OCU) Tributario</b>	18L: 0822998 UTM: 8514732	3720	21-jul-15	21-ago-15	21-sep-15	21-oct-15	21-nov-15	21-dic-15	21-ene-16	22-feb-16
<b>Caparay (CAP)</b>	18L: 0821984 UTM: 8513992	3717	21-jul-15	21-ago-15	21-sep-15	21-oct-15	21-nov-15	21-dic-15	21-ene-16	22-feb-16
<b>Ravilchaca (RAV) Tributario</b>	18L: 0821608 UTM: 8513998	3727	21-jul-15	21-ago-15	21-sep-15	21-oct-15	21-nov-15	21-dic-15	21-ene-16	22-feb-16
<b>Pongobamba Tributario (PT)</b>	18L: 0821108 UTM: 8513990	3723	21-jul-15	21-ago-15	21-sep-15	21-oct-15	21-nov-15	21-dic-15	21-ene-16	22-feb-16
<b>Escuela de Pongobamba (ESC)</b>	18L: 0820540 UTM: 8514229	3718	21-jul-15	21-ago-15	21-sep-15	21-oct-15	21-nov-15	21-dic-15	21-ene-16	22-feb-16
<b>Entrada de Agua a Cusco (ENT)</b>	18L:0819865 UTM: 8514396	3720	21-jul-15	21-ago-15	21-sep-15	21-oct-15	21-nov-15	21-dic-15	21-ene-16	22-feb-16
<b>Huilla – Huilla (HUI) Tributario</b>	18L: 819538 UTM: 8514820	3720	21-jul-15	21-ago-15	21-sep-15	21-oct-15	21-nov-15	21-dic-15	21-ene-16	22-feb-16
<b>Total = 80</b>			10	10	10	10	10	10	10	10

Dónde:

M1: Primer muestreo (JUL)      M4: Cuarto muestreo (OCT)      M7: Séptimo muestreo (ENE)

M2: Segundo muestreo (AGO)      M5: Quinto muestreo (NOV)      M8: Octavo muestreo (FEB)

M3: Tercer muestreo (SEP)      M6: Sexto muestreo (DIC)

### 2.3.2. TOMA DE MUESTRA

Se definieron 10 puntos de muestreo considerando la periferia del cuerpo léntico de estudio, por la factibilidad de su toma muestral. Correspondiendo las

fechas de muestreo de Julio a Octubre - 2015, sin precipitación pluvial y de Noviembre 2015 - Febrero 2016 época con precipitación pluvial.

El primer muestreo se efectuó en baldes de primer uso, que fueron debidamente enjuagados; para las repeticiones, los baldes fueron lavados con agua y detergente cepillados cuidadosamente y enjuagados con agua corriente en el laboratorio, una vez cerca al punto de muestreo se enjuago con el agua del punto en estudio.

Habiendo removido el limo muy suavemente, como indica la literatura consultada (10), se dispuso de baldes de 20 litros por cada punto de muestreo, cubiertos con sus propias tapas y debidamente etiquetados; transportadas con sumo cuidado por la movilidad contratada hasta la ciudad del Cusco; para cumplir con los procesos de estudio de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.* en el laboratorio C-224 de Parasitología y Técnicas Microscópicas en la Escuela Profesional de Biología-UNSAAC y en el Laboratorio del Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt – Sede Cusco, cito en José Carlos Mariátegui en la Urb. Santa Mónica.

### **2.3.3. PRUEBAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA:**

#### **2.3.3.1. TÉCNICA DE SEDIMENTACIÓN SIMPLE POR GRAVEDAD Y CENTRIFUGACIÓN BASADOS EN: METHODS OF MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF WASTEWATER: Vargas C, 1983.**

##### **2.3.3.1.1 FUNDAMENTO:**

La sedimentación por acción de la gravedad y la centrifugación permiten la concentración de ooquistes, quistes (fase latente de parásitos) y larvas, debido a su peso específico que oscila entre 1.045 a 1.170 mg, en el sedimento obtenido (66), lo que permite observarlos a microscopia de campo claro en frónticos coloreados efectuados de este sedimento.

##### **2.3.3.1.2. PROCEDIMIENTO:**

1. Se dejó en sedimentación simple por gravedad durante 24 horas cada una de las 10 muestras de los puntos mencionados anteriormente.
2. Se descartaron aproximadamente 12 litros del sobrenadante.

3. Los aproximadamente 8 litros restantes fueron distribuidos en envases de 1 litro dejando en sedimentación durante 8 horas.
4. Se descartó aproximadamente 500 ml del sobrenadante de cada envase de litro, los 500 ml fueron distribuidos a tubos de 50 ml para ser centrifugados a 2300 rpm durante 5 min.
5. Se descartó el sobrenadante recuperando el sedimento, conjunciando los sedimentos recuperados en tubos de 50 ml, los cuales fueron almacenado para su posterior utilización (67).
6. Dos tubos fueron preservados con formol al 10% para las técnicas de parasitología de Sheather – Sugar y Formol – éter y almacenados a 4°C.
7. Los otros dos tubos fueron almacenados a – 20 °C sin preservante para la extracción de ADN.

### **2.3.3.2.TÉCNICA DE SHEATHER – SUGAR POR FLOTACIÓN CON CENTRIFUGACIÓN PARA QUISTES Y OOQUISTES (Sheather, Joseph William George; 1923) (68).**

#### **2.3.3.2.1. FUNDAMENTO.**

Basada en la técnica de flotación con sulfato de Zinc propuesto por “American Public Health Association” en 1981, la técnica de Sheather usada es la descrita en el Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de los Parásitos Intestinales del Hombre propuesto por el Instituto Nacional de Salud del 2003; por sus antecedentes de mayor sensibilidad y menor costo, la técnica de Sheather fue tomada como la “gold estándar” (69).

Esta técnica consiste en la concentración por flotación de quistes, ooquistes y huevos de parásitos en una solución de azúcar que posee mayor densidad que ellos. Esta técnica es útil para la concentración de quistes y ooquistes de protozoos y huevos de helmintos y se usa como método preferencial en el diagnóstico de los coccidios: *Cryptosporidium sp*, *Cyclospora sp*, *Cystoisospora sp*, etc (68).

Se siguió el Protocolo de flotación del Instituto Nacional de Salud en el año 2003.

Se preparó un total de 320 láminas; con una repetición de 4 láminas por punto de muestreo de cada mes, a partir del sobrenadante obtenido por la técnica de flotación de Sheather; se agregó Lugol parasitológico Dobell & O'connor y las lecturas se realizaron al microscopio a 10X y 40X, dónde se observaron los quistes presentes en cada lámina; dando cómo resultados positivos toda estructura que concuerde con las características morfológicas de los quistes descritos anteriormente.

#### **2.3.3.2.2. PROCEDIMIENTO.**

- El sedimento de las muestras provenientes de la sedimentación por gravedad y centrifugación, fueron nuevamente concentrados a centrifugación por 2300 rpm por 2 minutos.
- Se descartó 30 ml de sobrenadante con una pipeta Pasteur.
- Se agregó 30ml de solución Sheather.
- Las muestras fueron sometida al vortéx para una mejor homogenización; durante un minuto, luego fueron centrifugadas a 2300 rpm por 4 minutos.
- Se esperó 10 minutos para que las partículas menos densas fueran suspendidas en la superficie.
- Se tomó inóculos de la capa superficial; se prepararon 4 láminas con lugol parasitológico Dobell & O'Connor por punto de muestreo y fueron leídas inmediatamente al microscopio a 10X y 40X evitando así la cristalización de la muestra.

Para realizar la coloración Kinyoun fue necesario eliminar la solución azucarada de Sheather, siguiendo los siguientes pasos:

- Para el lavado de la muestra, se tomó los 15 ml de sobrenadante superficial, se agregó 35 ml de agua corriente en tubos nuevos de 50 ml y fueron centrifugados a 2300 rpm por 2 minutos (el procedimiento de lavado fue repetido 2 veces),
- Se realizó extendidos en 3 láminas portaobjetos dejándolas secar a temperatura ambiente para su posterior coloración (68).

### **2.3.3.3. TÉCNICA DE CERTEZA PARASITOLÓGICA COLORACIÓN KINYOUN PARA COCCIDIOS (Kinyoun, Joseph James; 1915) (68).**

#### **2.3.3.3.1. FUNDAMENTO.**

La capa central de la pared ooquistica se caracteriza por ser rígida y electrodensa (de 10 nm de espesor), de composición lipídica y glicoproteica (70), que le confiere el comportamiento ácido-resistente de la cubierta de los coccidios; los cuales se tiñen de fucsia o rojo y destacan sobre un fondo verde o azul, dependiendo del colorante de contraste usado (68).

Se siguió el protocolo de coloración del Instituto Nacional de Salud en el año 2003 (68).

Se prepararon un total de 240 láminas; con una repetición de 3 láminas por punto de muestreo por cada mes, a partir del concentrado obtenido por la técnica de flotación de Sheather. Se realizó la coloración Kinyoun, cuya lectura fue realizada al objetivo de 100X al microscopio, dónde se contaron los ooquistes presentes en cada lámina; dando como resultados positivos toda estructura que concuerde con las características morfológicas de los ooquistes descritos anteriormente y la capacidad de ser alcohol ácido – resistente.

#### **2.3.3.3.2. PROCEDIMIENTO.**

- La lámina con el extendido previamente realizado se fijó con metanol y se dejó secar a temperatura ambiente.
- Se cubrió la lámina con la fucsina fenicada por 30 minutos\*.
- Se enjuagó suavemente el frotis, con agua corriente.
- Se decoloró con alcohol-ácido, cubriendo el portaobjeto por 1 minuto, hasta quitar el colorante.
- Se lavó suavemente el frotis con agua corriente.
- Se colocó como colorante de contraste, azul de metileno durante 5 minutos.
- Se lavó el frotis suavemente con agua corriente y se dejó secar a temperatura ambiente.
- Como es de norma, se observó con el mayor aumento (100X) a inmersión homogénea al microscopio (68).

#### **2.3.3.4. TÉCNICA DE FÓRMOL – ÉTER PARA HUEVOS Y LARVAS DE HELMINTOS (Técnica de Nicoll, Charles y Barthelemy, Jean Auguste; 1917).**

##### **2.3.3.4.1. FUNDAMENTO**

La técnica consiste en concentrar por sedimentación, huevos de Helmintos, larvas de *Nemátodos* que no pueden ser aisladas por el método de flotación. Esta técnica de formol – éter es la mejor y la más efectiva para detectar *Schistosomas*, *Uncinarias* y huevos de *Ascaris*; dónde el formol se encarga de conservar las estructuras y el éter; que por ser menos denso, forma un tampón en la superficie del tubo; permitiendo que las formas parasitarias se liberen de las grasas por disolución de las mismas, reúne los detritus (algas, microinvertebrados y macrovertebrados) y clarifica las muestras (71).

##### **2.3.3.4.2. PROCEDIMIENTO.**

- Se centrifugó las muestras previamente sedimentadas por gravedad de cada punto de muestreo a 2300 por 2 minutos para obtener el sedimento.
- Se descartó 25 ml del sobrenadante con una pipeta Pasteur, se agregó 10ml de formol al 10% y 5ml de éter etílico.
- Se agitó la muestra vigorosamente durante 20 segundos, luego se centrifugó a 2300 rpm durante 2 minutos.
- Se eliminó el tapón de detritus que se forma en la superficie.
- El sedimento se trasvasó a una placa Petri para observación a 10x y 40X al microscopio de campo claro, buscando huevos de Helmintos y larvas (27).

#### **2.3.4. TÉCNICAS MOLECULARES**

##### **2.3.4.1. EXTRACCIÓN DE ADN POR MAG BIND SOIL DNA KIT.**

###### **2.3.4.1.1. FUNDAMENTO.**

El kit de extracción de ADN: Mag-bind Soil permite el aislamiento de ADN genómico de alta calidad a partir de diversas muestras de sedimento. El



sistema combina la tecnología de la placa magnética con el Reactivo Removedor de Inhibidores (HTR).

Las muestras se introducen a una placa magnética: spin-DNA HiBind, cargado de manera aniónica; que atrae al ADN hacia éste, mediante la unión con las partículas CND, cargados positivamente. Dos pasos rápidos de lavado eliminan los contaminantes traza y el ADN puro se eluye en un tampón de baja fuerza iónica, obteniendo ADN purificado de alta calidad (72).

#### **2.3.4.1.2. PROCEDIMIENTO.**

Se realizaron en total 80 extracciones de ADN del material que se obtuvo por el proceso de sedimentación, pertenecientes a los 10 puntos de muestreo durante 8 meses.

- Se pesó 500 mg de perlas de vidrio y se colocó en tubos de polietileno con tapa rosca de 5 ml libres de DNAsas.
- Se tomó aproximadamente 1g de la pasta obtenida de la sedimentación de las muestras de agua y se introdujo a los tubos de 5 ml de tapa rosca.
- Se añadió 0.6 ml de Buffer SLX-Mlus. Las muestras fueron sometidas al máximo vortéx durante 10 minutos\* para lisar las muestras.
- Se añadió 60 µl de Buffer DS y se sometió al máximo vortéx durante 10 minutos.
- Las muestras fueron incubadas a 70°C por 20 minutos, durante la incubación, éstas fueron sometidas al vortéx una vez. Nuevamente las muestras fueron incubadas a 95°C durante 20 minutos.
- Las muestras (1000 µl de sobrenadante) fueron trasvasadas a tubos de microcentrífuga de 2 ml libre de ADNAsas.
- Se centrifugaron los tubos a 14 000 RPM durante 5 minutos en la ultracentrífuga a temperatura ambiente.
- Se transfirió 400 µl de sobrenadante a nuevos tubos de microcentrífuga de 2 ml, libres de ADNAsas.
- Se añadió 133 µl de Buffer SP2, las muestras fueron sometidas al vortéx durante 30 segundos.

- Se añadió 133  $\mu\text{l}$  del reactivo HTR, se sometió al vortéx durante 10 segundos. Las muestras fueron incubadas en el hielo durante 5 minutos.
- Se volvió a centrifugar a 14 000 RPM durante 5 minutos.
- Cuidadosamente, se transfirió el sobrenadante (600  $\mu\text{l}$ ) a nuevos tubos de microcentrifuga de 2 ml, libre de ADNAsas.
- Se añadió 300  $\mu\text{l}$  de Buffer XP2, 20  $\mu\text{l}$  de partículas CND Mag-Bind, 5  $\mu\text{l}$  del reactivo Binding Enhancer y todos los tubos fueron sometidos al vortéx por 10 segundos.
- Los tubos fueron dejados a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 14 000 RPM durante 2 minutos.
- Después, los tubos fueron introducidos en la placa magnética para separar las partículas CND Mag-Bind del resto de la solución. Esto a temperatura ambiente, hasta que la solución haya aclarado.
- Se aspiró y se descartó todo el sobrenadante, sin retirar los tubos de la placa magnética; teniendo cuidado de no mover ni alterar a las partículas pegadas a la pared del tubo, se separó los tubos de la placa magnética.
- Se añadió 500  $\mu\text{l}$  de Buffer XP2, y se sometió al vortéx durante 10 segundos, después los tubos fueron dejados a temperatura ambiente por 2 minutos y posteriormente se centrifugaron a 14 000 RPM durante 2 minutos\*.
- Los tubos fueron nuevamente introducidos a la placa magnética; a temperatura ambiente y hasta que la solución se haya aclarado.
- Se aspiró y descartó el sobrenadante sin perturbar las partículas pegadas a la pared del tubo. Se separó los tubos de la placa magnética.
- Se añadió 500  $\mu\text{l}$  de Buffer VHB, los tubos fueron sometidos al vortéx durante 10 segundos. Estos fueron dejados a temperatura ambiente por dos minutos. Las muestras se centrifugaron a 14 000 RPM durante 2 minutos.
- Los tubos fueron nuevamente introducidos a la placa magnética; a temperatura ambiente y hasta que la solución se haya aclarado.

- Se aspiró y descartó el sobrenadante sin perturbar las partículas pegadas a la pared del tubo, posteriormente se separó los tubos de la placa magnética.
- Se añadió 500 µl de Buffer de lavado SPM y se sometió al vortéx durante 10 segundos. Se dejó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Las muestras se centrifugaron a 14 000 RPM durante 2 minutos.
- Los tubos fueron nuevamente introducidos a la placa magnética; a temperatura ambiente y hasta que la solución se haya aclarado.
- Se aspiró y descartó el sobrenadante sin perturbar las partículas pegadas a la pared del tubo, posteriormente se separó los tubos de la placa magnética.
- Se repitieron los pasos anteriores de lavado, una vez más.
- Con pipetas de 200 µl, se removió cualquier tipo de residuo líquido que haya podido quedar dentro de los tubos; teniendo cuidado de no perturbar las partículas. Se separaron los tubos de la placa magnética y se dejaron abiertos durante dos horas dentro de la cámara de Bioseguridad tipo II.
- Se añadió 50 µl de Buffer de Elución, el que fue previamente calentado a 65°C en la incubadora al seco, durante 5 minutos, los tubos fueron sometidos a vortéx durante 20 segundos y luego fueron centrifugados a 14 000 RPM durante 2 minutos.
- Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Los tubos fueron introducidos en la placa magnética hasta que la solución se haya aclarado completamente.
- Se transfirió todo el sobrenadante claro a nuevos tubos de microcentrífuga de 1.5 ml libre de ADNAsas, los cuales fueron rotulados debidamente por cada punto de muestreo.

Protocolo modificado en base al Manual de Revisión de Mag-Bind Soil DNA Kit, 2014.\*

- La determinación de la concentración y pureza del ADN se por espectrofotometría (Nanodrop 2000), previamente se calibró el espectrofotómetro con 2 µl de agua libre de nucleasas.
- Se utilizó 2µl de muestra para cada lectura; los resultados fueron debidamente anotados.
- Las muestras fueron conservadas a -20°C para su posterior uso en PCR en tiempo real.

#### **2.3.4.2. PCR EN TIEMPO REAL**

##### **2.3.4.2.1. FUNDAMENTO.**

Detecta ADN a partir de pequeñas cantidades, amplificándolas hasta más de un billón de veces (60), aun teniendo una cantidad muy pequeña de muestra, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia (62).

El Master Mix SYBR Green PCR es una premezcla conveniente de los componentes (excepto cebadores, muestra y agua) necesaria para llevar a cabo PCR en tiempo real utilizando colorante SYBR Green. La detección directa de producto de PCR se controla midiendo el aumento de la fluorescencia causada por la unión del fluorocromo SYBR Green a ADN de doble cadena (73).

##### **2.3.4.2.2. PROCEDIMIENTO.**

Se realizó el protocolo basado en SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (73).

- La cámara de Bioseguridad y todo el material a utilizar fue previamente desinfectado con lejía al 5%, se activó la cámara de bioseguridad 20 minutos antes de empezar con el procedimiento y estabilizar el flujo de aire.
- Todas las muestras y reactivos fueron sometidos a vortéx y spin down.
- Se utilizó packs de hielos para mantener las bajas temperaturas y evitar la denaturación del DN.
- Se preparó un Master Mix con un volumen final de 18 µl por pocillo de reacción, dicho master mix estuvo compuesto por: 10 µl de SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, 1µl de cada uno de los

Primers (concentración: 10 µM), 6µl de agua libre de nucleasas. Se calculó el volumen necesario de master mix teniendo en cuenta el número de muestras por duplicado más uno.

- Se colocó 2 µl de muestra de ADN problema de cada punto de muestreo (añadido directamente a la placa) y 18 µl de Master Mix, obteniendo un volumen final de 20 µl por pocillo.
- Se pipeteó el control negativo, después las muestras problemas y finalmente el control positivo, para evitar contaminación.
- Los pocillos fueron sellados con Micro Seal e introducidos dentro del termociclador (56), y se inició con el procedimiento de la PCR en tiempo real.

#### **2.3.4.3. ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL PARA**

*Cryptosporidium parvum* y *Giardia intestinalis*.

Tanto para la PCR de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia intestinalis*, se realizaron en total 160 reacciones de PCR, cada muestra por duplicado.

##### **2.3.4.3.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL PARA**

*Cryptosporidium parvum*.

Los primers para la corrida de la PCR para *Cryptosporidium parvum* fueron Forward: 5' CTC CAC CAA CTA AGA ACG GCC 3' y Reverse: 5' TAG AGA TTG GAG GTT GTT CCT 3' cuyo T<sub>m</sub> es 55.4 °C, Los primers fueron diseñados por el PhD. Alejandro Castellanos – Universidad Branch de Texas.

El protocolo sugerido según SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (73) es el siguiente.

- Pre calentamiento a 50°C durante 3 minutos.
- Denaturación inicial (activación de la polimerasa) a 98°C durante 2 - 3 minutos.
- Temperatura de denaturación 95 - 98 °C de 5 - 15 segundos.
- Temperatura de Annealing y Extensión 60 °C de 15 -30 segundos.
- Numero de ciclos a repetir entre 35 y 40.

- Análisis de la curva Melting, de 65 a 95 °C incrementando 0.5 °C cada de 2 a 5 segundos.

**NOTA:**

- 98°C es altamente recomendable para la muestra de ADN genómico porque asegura una completa Denaturación.
- Para amplicones menores a 100 pb, el tiempo de Anneling y Extensión deben ser más cortos de 1 a 10 segundos.
- Para amplicones mayores a 250 pb, el tiempo de Anneling y Extensión deben ser más largo de 40 a 60 segundos.

Se realizó la estandarización del PCR en tiempo real basados en el protocolo SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, describiendo las condiciones para *Cryptosporidium parvum*, seguidamente:

- Precalentamiento a 50°C durante 3 minutos.
- Denaturación inicial de 98° durante 5 minutos. (\*)
- Denaturación a 95° durante 15 segundos.
- Anillamiento a 65°C durante 35 segundos. (\*)
- Elongación a 72°C por 35 segundos. (\*)
- El número de ciclos es de 40 en los que se repiten los tres últimos pasos.
- Curva de fusión a 65° C durante 5 segundos incrementa hasta 95°C, es en este punto del PCR en tiempo real, donde se realizó una lectura de placa, en la cual nos muestra la temperatura melting que en el caso de la PCR en tiempo real para *Cryptosporidium parvum*, es de 84 °C.

(\*) Pasos modificados en temperatura y/o tiempo basados en el protocolo teórico.

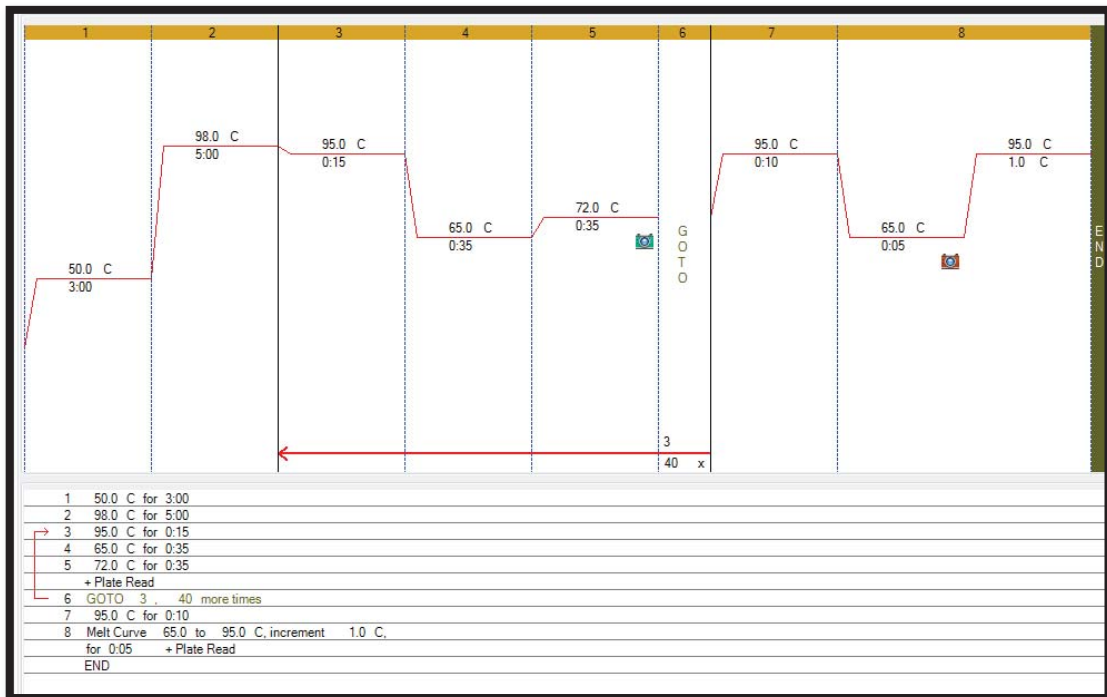


Figura N° 10: Protocolo del termociclador para PCR en tiempo real de *Cryptosporidium parvum*, estandarizado según las temperaturas indicadas en los primers.

#### 2.3.4.3.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR PARA *Giardia intestinalis*.

Los primers para la corrida de la PCR para *Giardia intestinalis*, fueron; Forward: 5' GAC GGG TCA GGA CAA CGG TT 3' y Reverse 5' TTG CCA GCG GTG TCC G 3', cuyo Tm es 60°C, primers que fueron diseñados por el PhD. Zachary Austin Crannell – Universidad Branch de Texas.

El protocolo sugerido según SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (73) es el siguiente.

- Pre calentamiento a 50°C durante 3 minutos.
- Denaturación inicial (activación de la polimerasa) a 98°C durante 2 - 3 minutos.
- Temperatura de denaturación 95 - 98 °C de 5 - 15 segundos.
- Temperatura de Annealing y Extensión 60 °C de 15 -30 segundos.
- Numero de ciclos a repetir entre 35 y 40
- Análisis de la curva melting, de 65 a 95 °C incrementando 0.5 °C cada de 2 a 5 segundos.

**NOTA:**

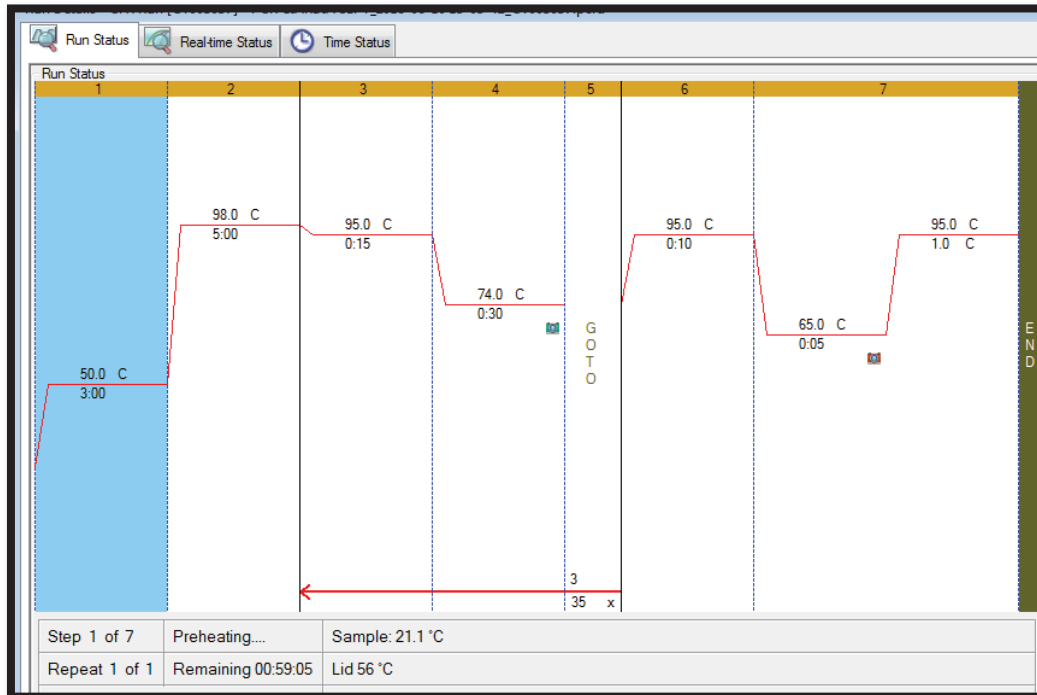
- 98°C es altamente recomendable para la muestra de ADN genómico porque asegura una completa Denaturación.
- Para amplicones menores a 100 pb, el tiempo de Anneling y Extensión deben ser más cortos de 1 a 10 segundos.
- Para amplicones mayores a 250 pb, el tiempo de Anneling y Extensión deben ser más largo de 40 a 60 segundos.

Se realizó la estandarización del PCR en tiempo real basados en el protocolo SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, para *Giardia intestinalis*:

- Pre calentamiento a 50°C durante 3 minutos.
- Denaturación inicial de 98° durante 5 minutos. (\*)
- Denaturación a 95, durante 15 segundos.
- Anillamiento y Elongación a 74°C durante 30 segundos. (\*)
- El número de ciclos es de 35 en los que se repiten los tres últimos pasos (Denaturación, Anillamiento, Elongación).
- Curva de fusión de 65° C durante 5 segundos incrementando hasta 95°C, es aquí donde se realiza una lectura de placa, que muestra la temperatura melting que en el caso de la PCR para *Giardia intestinalis*, es de 87 °C.

(\*) Pasos modificados en temperatura y/o tiempo basados en el protocolo teórico.





**Figura N° 11: Protocolo del termociclador para PCR en tiempo real de *Giardia intestinalis*, estandarizado según las temperaturas indicadas en los primers.**

#### 2.4. ANALISIS DE DATOS.

Para realizar el análisis estadístico de la investigación, se tomó en cuenta los datos obtenidos en la prueba molecular de PCR en tiempo real por ser la técnica más sensible y específica, mediante el análisis estadístico t – student se analizó igualdad o diferencia entre los promedios de los meses con ausencia y presencia de lluvias; y mediante la prueba de ANOVA se evaluó diferencia significativa entre los puntos de muestreo.

### CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. RESULTADOS POR TÉCNICAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA EN EL CUERPO LÉNTICO DE PIURAY, DURANTE EL PERIODO JULIO 2015 A FEBRERO 2016.

##### 3.1.1. RESULTADOS POR LA TÉCNICA SHEATHER – COLORACIÓN KINYOUN PARA *Cryptosporidium sp.*

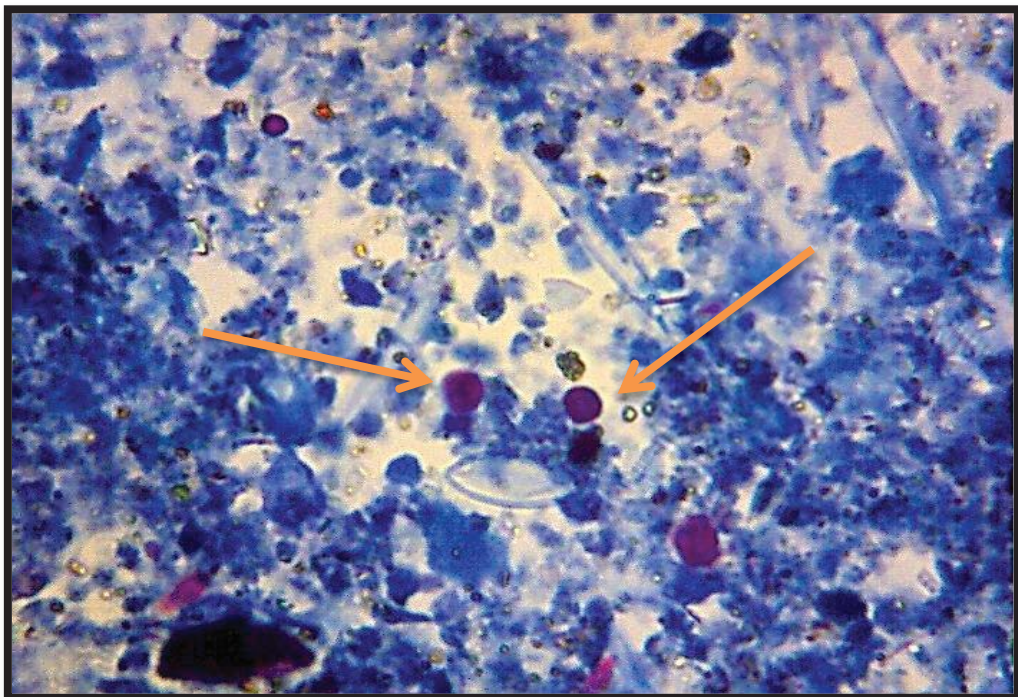
En la tabla número 05, se presenta el total de ooquistes cuantificados en 3 láminas sometidas a la coloración Kinyoun, de cada punto de muestreo correspondiente a cada mes de estudio (20L).

**Tabla N° 5: Distribución de los resultados de la técnica de certeza parasitológica coloración Kinyoun para *Cryptosporidium sp.***

PUNTOS DE MUESTREO	COLORACIÓN KINYOUN - N° OOQUISTES / L									FRECUENCIA
	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	Σ	
PT	0	0.45	0.15	0.15	0	0	0	0	0.75	3.8%
ESC	0	0.25	0	0	0.1	0.25	0.55	2.51	3.66	6.3%
ENT	0	0	0.15	0	0	0	0.4	0.25	0.8	3.8%
CB	1.85	2.05	1.35	0.6	0.75	1.6	1.5	2.35	12.05	10%
CAP	1	0.35	0.8	0	0	0.85	0.8	0.05	3.85	7.5%
PUC	0.3	0	0	0	0	0	0	0.25	0.55	2.5%
RAV	0	0	0	0	0.4	0	0	0.25	0.65	2.5%
OCU	0	0	0	0	0.15	0.5	0	0.45	1.1	3.8%
HUI	0	0.1	0	0.75	0	0.35	0	0.35	1.55	5%
SIP	0	0	0.3	0	0.3	0	0.85	0.6	2.05	5%
Σ	10.6				16.41				27.01	50.2%

Según el Estándar de Calidad Ambiental para el Agua D.S N° 002-2008-MINAM (11) modificado por la Legislación Medio Ambiental D.S N° 015-2015-MINAM (12), los cuales evalúan los parámetros microbiológicos y parasitológicos presentes en las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable, indican que el número de formas parasitarias deben ser “0 organismos/L” y como se observa en la tabla N° 05, el punto más crítico fue Cúper Bajo (CB), reportando hasta 2.35 ooquistes/L en el mes de Febrero, ya que la presencia de ganado pecuario, actividad antrópica y escorrentía de desagües que directamente llegan al cuerpo de agua son factores que inciden en la contaminación, característico de este punto; el punto Escuela (ESC)

reportó hasta 2.51 ooquistes/L, sitio que presenta actividad ganadera alta (bebedero de animales), actividad agraria y contaminación con residuos sólidos además, se observó *in situ* una infiltración de desagüe proveniente de la escuela Pongobamba en el mes de Julio; los resultados observados en la tabla N° 05 superan el valor permitido en los Estándares de Calidad Ambiental presentados por el Ministerio de Medio Ambiente del Perú, además se observó claramente un incremento de los ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, en los meses con presencia de lluvia, datos que deben ser tomados en cuenta por la empresa potabilizadora de agua para que tome los controles adecuados. En las figuras N° 10 – 14, se observa las fotografías tomadas a los ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, encontrados en diferentes puntos de muestreo. Las formas parasitarias se observan de color fucsia debido a la estructura ácido resistente del ooquiste, en contraste con el fondo del azul de metileno en la coloración Kinyoun.



**Figura N° 12: Ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, con técnica de certeza parasitológica (coloración Kinyoun), encontrados en el punto de Escuela de Pongobamba a 10000X, considerando una ampliación de cámara de 10X.**

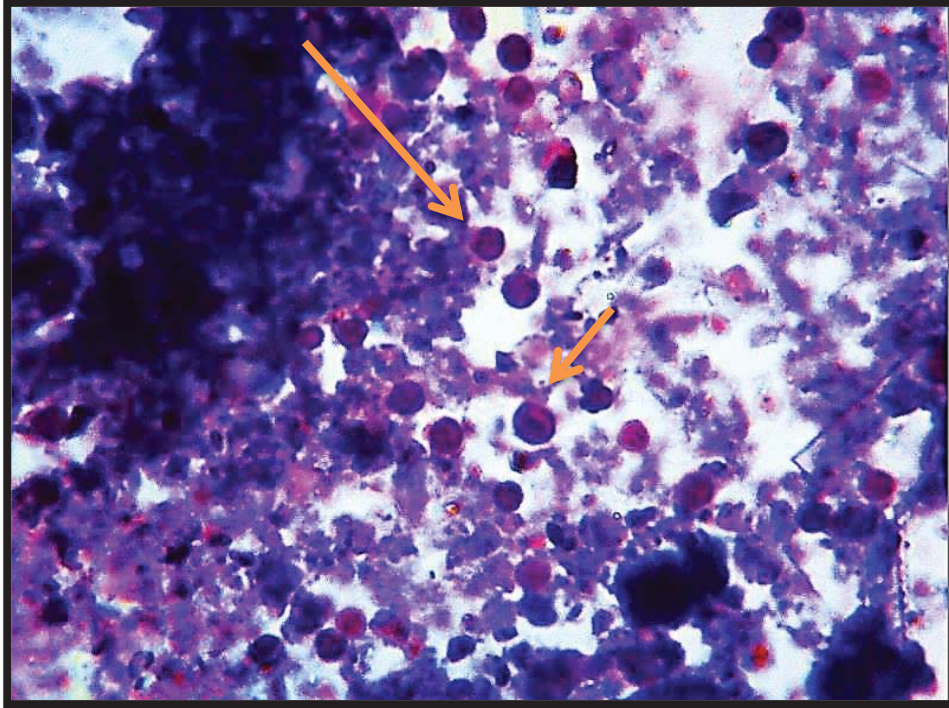


Figura N° 13: Ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, con técnica de certeza parasitológica - coloración Kinyoun, encontrados en el punto de muestreo de Cuper Bajo a 10000X, considerando una aplicación de cámara de 10X.

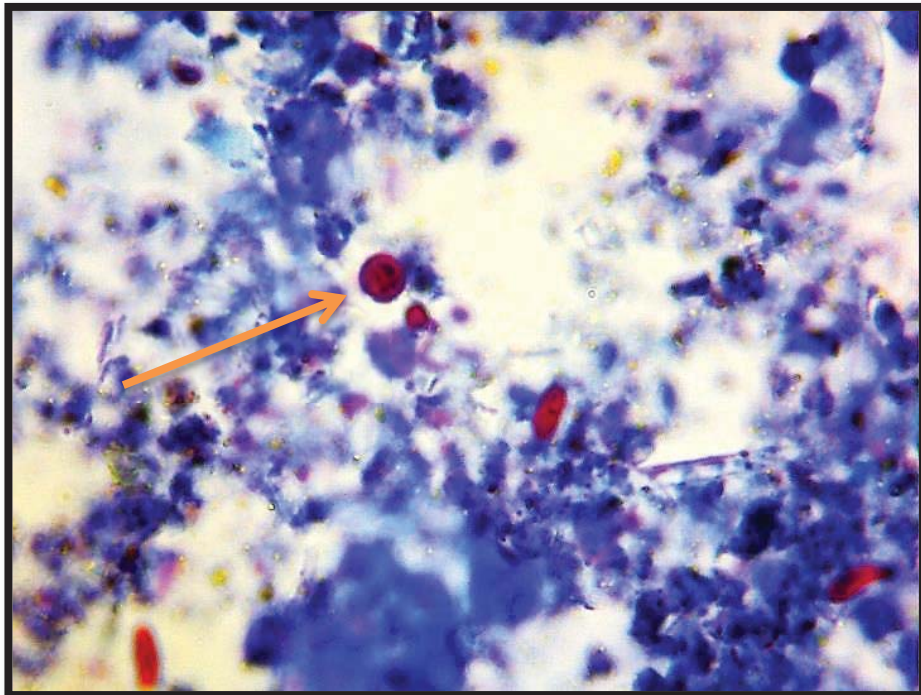


Figura N° 14: Ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, con técnica de certeza parasitológica - coloración Kinyoun, encontrados en el punto de muestreo de Ravilchaca a 10000X, considerando una aplicación de cámara de 10X.

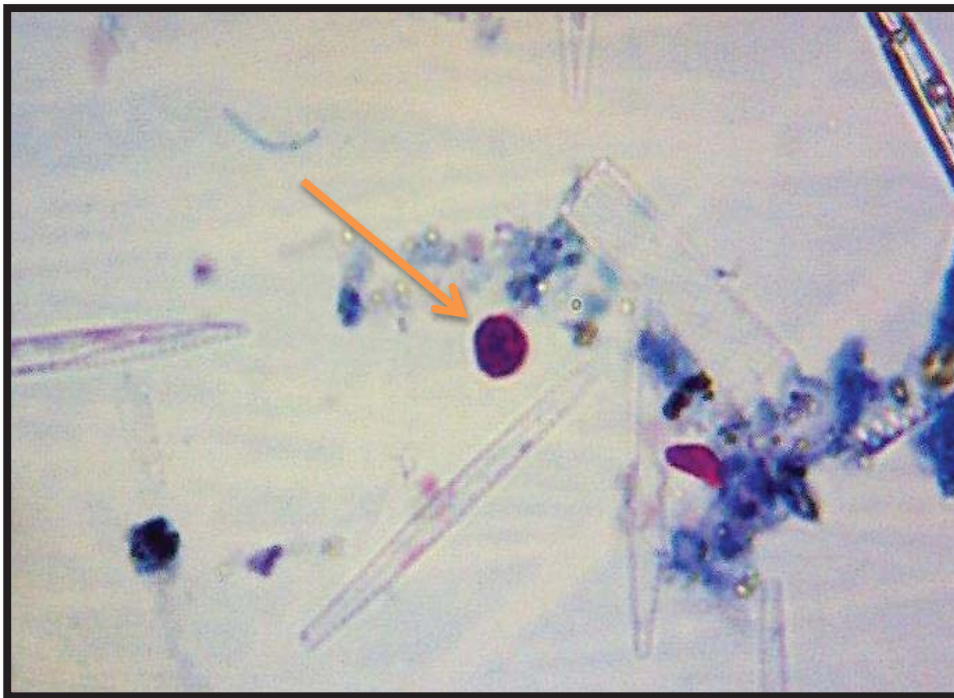


Figura N° 15: Ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, con técnica de certeza parasitológica - coloración Kinyoun, encontrados en el punto de muestreo de Entrada 10000X, considerando una aplicación de cámara de 10X.

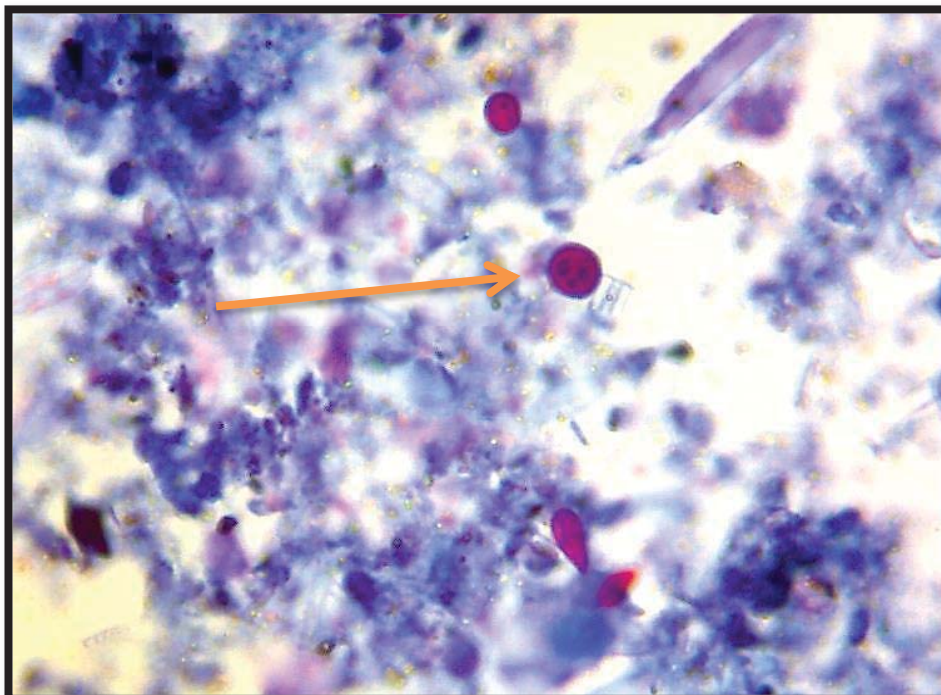


Figura N° 16: Ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, con técnica de certeza parasitológica (coloración Kinyoun), encontrados en el punto de muestreo Caparay 10000X, considerando una aplicación de cámara de 10X.

### 3.1.2. RESULTADOS POR LA TÉCNICA SHEATHER – LUGOL DOBELL O´CONNOR PARA *Giardia sp.*

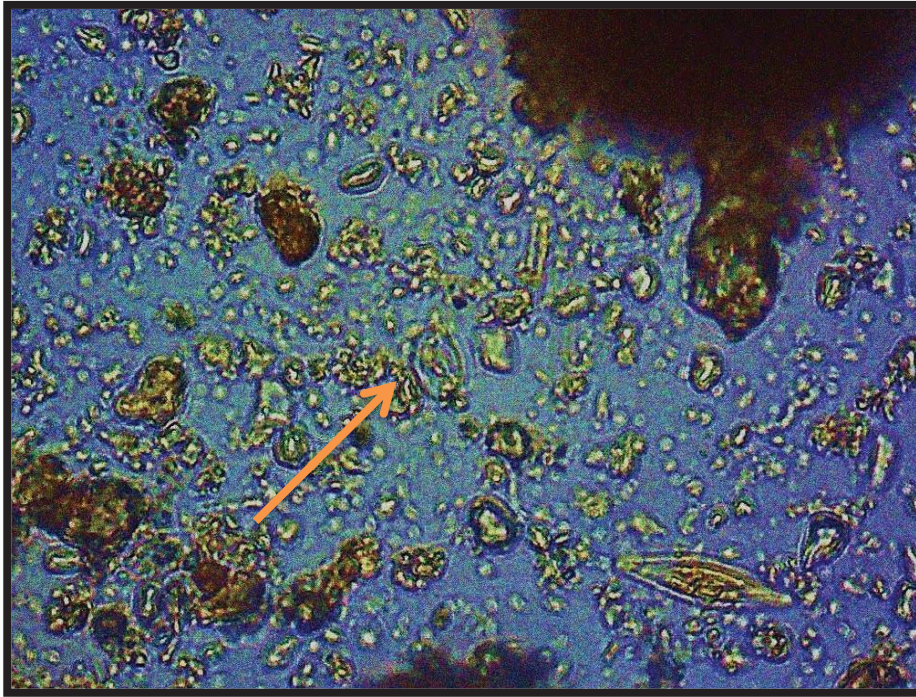
En la tabla N° 06, se presenta el total de quistes cuantificados en 4 láminas observadas con lugol Dobell O´connor, por cada punto de muestreo correspondiente a cada mes.

**Tabla N° 6: Resultados de la técnica de certeza parasitológica Sheather – Lugol parasitológico Dobell O´connor para evaluar *Giardia sp.***

PUNTOS DE MUESTREO	LUGOL PARASITOLÓGICO DOBELL O´CONNOR - N° QUISTES/L									
	JUL	AGO	SEPT	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	Σ	FRECUENCIA
PT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0%
ESC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0%
ENT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0%
CB	0.05	0	0	0	0	0	0	0	0.05	1.3%
CAP	0	0	0.05	0	0	0	0	0	0.05	1.3%
PUC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
RAV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
OCU	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0.05	1.3%
HUI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
SIP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
Σ	0.1			0.05			1.5		3.8%	

Según el Estándar de Calidad Ambiental para el Agua D.S N° 002-2008-MINAM (11) modificado por la Legislación Medio Ambiental D.S N° 015-2015-MINAM (12), los cuales evalúan los parámetros microbiológicos y parasitológicos presentes en las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable, indican que el número de *Giardia intestinalis* debe ser “0 organismos/L”, y como se observa en la tabla N° 06, los valores reportados en la mayoría de puntos se encuentran dentro de los rangos permisibles, sin embargo se reportaron 0.05 quistes/L en tres puntos de muestreo Cuper Bajo, Caparay, Ocutuán.

En la figura N° 17 se observa un quiste de *Giardia sp.*, observado en el punto de muestreo de Caparay. En esta forma parasitaria se destaca el axostilo característico de este género.



**Figura N° 17: Figura N° 17: Quistes de *Giardia sp.*, con técnica de certeza parasitológica Sheather – Lugol Dobell & O'Connor, encontrados en el punto de muestreo Caparay 10000X, considerando una aplicación de cámara de 10X.**

M. Zumaeta (10), indica que los ooquistes de *Cryptosporidium sp.* y los quistes de *Giardia sp.* se encuentran dispersos en los cuerpos de agua superficial y en los sistemas de agua potable y para su estudio éstos deben ser concentrados. La mayoría de investigadores sugieren de 100 a 1 000 galones de muestra (25); pero aún no está estandarizado el volumen de muestra necesario para el análisis de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.* en el agua, sin embargo para estar acorde con la segunda opinión se consideró un volumen total de muestra correspondiente a 1 600 L (422.4 galones) en el total de muestreos reiterativos de los diez puntos muestrales, durante los ocho meses.

Según la Asociación Nacional de Salud Veterinaria Pública de los Estados Unidos en el año 2011 (74); la piel, el pelo, la saliva y excretas de los animales albergan organismos fecales. Los animales portadores de patógenos entéricos humanos, con frecuencia no muestran signos de enfermedad; pero aún puede arrojar los organismos, contaminando el medio ambiente ya que estos agentes zoonóticos pueden permanecer periodos largos en el exterior de los organismos. Además se ha constatado por técnica de certeza parasitológica, la

presencia de huevos tipo *Uncinarias*, *Ascaris*, y larvas de *Strongylos*, así como algunos nemátodos de la rizósfora.

### 3.2. RESULTADOS POR LA TÉCNICA MOLECULAR PCR EN TIEMPO REAL EN EL CUERPO LÉNTICO DE PIURAY DURANTE EL PERIODO JULIO 2015 A FEBRERO 2016.

#### 3.2.1. RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE LAS MUESTRAS DE ADN EXTRAÍDAS.

Como resultado de las extracciones de ADN de las 80 muestras (10 puntos de muestreo durante 8 meses) se obtuvo la tabla N° 07, en el cual los rangos de concentración van desde 9.9 – 75.1 ng/μl de ADN leídos en el Nanodrop, cabe recalcar que las concentraciones de ADN obtenidas no evidencian únicamente el material genético de los parásitos investigados; sino también el ADN procedentes de otros organismos ligados al cuerpo léntico.

**Tabla N° 7: Concentración del ADN extraído en los 10 puntos muestrales del cuerpo léntico de Piuray durante el periodo Julio 2015 a Febrero 2016.**

CONCENTRACION DE ADN ng/μl								
PUNTOS DE MUESTREO	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB
PT	16.1	49.1	64.6	52.8	30.7	28.4	38.3	54.5
ESC	32.1	39.9	47.5	45.1	31.3	21.2	52.7	51.3
ENT	39.7	45.4	45.9	52.1	31.6	51.1	25.6	46.7
CB	20	17.1	24.8	29	23	24.8	32.1	41.1
CAP	25	30.8	57.3	38.2	24.4	21.3	26	52.6
PUC	50.6	60.4	45.7	48.4	30.4	25.3	31.9	15.4
RAV	50.8	26.9	33.7	41.9	28.8	<b>9.9</b>	46.1	51.6
OCU	69.5	<b>75.1</b>	49.8	46.8	38.7	27.1	42.8	35.2
HUI	36.9	33.9	29	32.1	36.2	66.5	42.1	45.4
SIP	56.2	33.8	53.7	37.2	28.5	19.5	45.5	27.7

Para un buen procedimiento de PCR en tiempo real, se necesita tener una muestra de ADN altamente pura, sin contaminantes. El rango de pureza teórica va de 1.8 – a 2.22 (62), lo que indica que no existe contaminación y hay una buena extracción. En la tabla N° 08, se muestra los rango de pureza obtenidos: 1.83 – 2.98, demostrando un buen procedimiento de extracción.



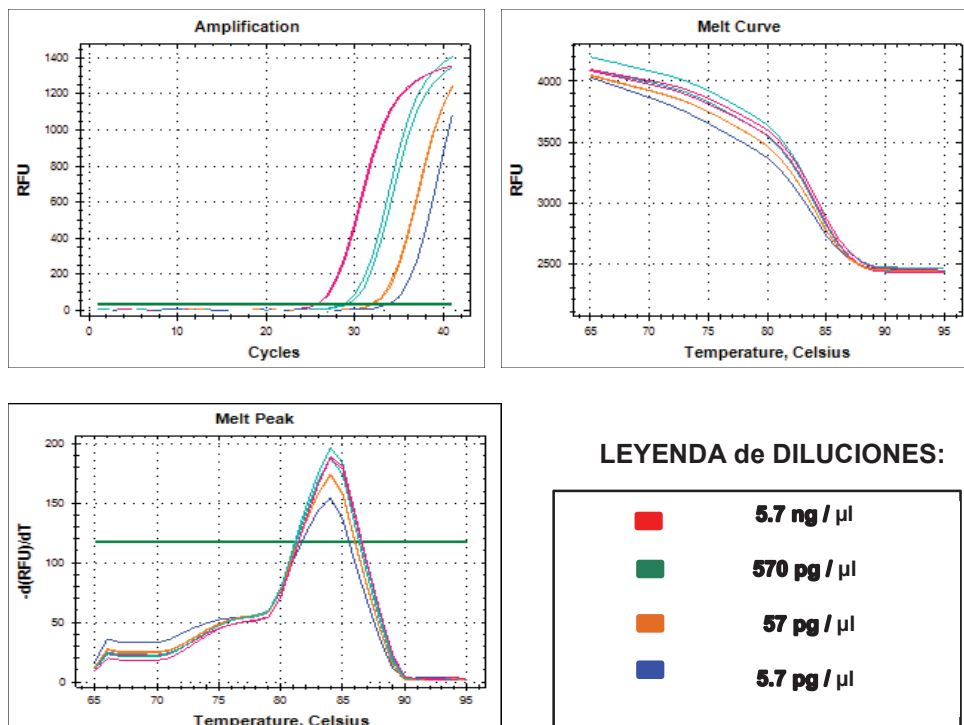
**Tabla N° 8: Pureza del ADN extraído en los 10 puntos de muestreo del cuerpo léntico de Piuray durante el periodo Julio 2015 a Febrero 2016.**

PUREZA DE ADN 260/280								
PUNTOS DE MUESTREO	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB
PT	2.17	2.05	1.94	2.19	1.85	1.83	1.92	1.80
ESC	1.97	2.05	1.97	2.02	1.82	1.81	1.89	1.84
ENT	1.97	2.01	2.05	1.97	1.88	1.84	1.97	1.88
CB	1.99	2.18	2.06	1.95	1.81	1.86	1.87	1.88
CAP	2.05	2.23	2.06	2.11	1.96	1.84	1.80	1.85
PUC	1.97	1.97	2.11	1.95	1.84	1.81	1.84	1.95
RAV	2.16	2.10	2.02	1.91	1.84	1.83	1.89	1.85
OCU	1.99	2.00	1.93	2.10	1.96	1.81	1.89	1.89
HUI	2.07	2.06	2.27	2.98	1.90	1.83	1.88	1.89
SIP	1.96	2.41	2.10	2.11	1.88	1.86	1.87	1.88

### 3.2.2. LÍMITE DE DETECCIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL PARA

*Cryptosporidium parvum*:

Se determinó el límite de detección de la PCR en tiempo real para *Cryptosporidium parvum*, se utilizó cuatro diluciones de 1/10 de ADN puro del parásito mencionado en concentraciones de 5.7 ng/μl, 570 pg/μl, 57 pg/μl, y 5.7 pg/μl, logrando detectar la última dilución.



**Figura N° 18: Curvas de límite de detección para *Cryptosporidium parvum* en PCR en tiempo real.**

### 3.2.3. PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Cryptosporidium parvum*:

En la tabla N° 09 se aprecia los resultados positivos (indicados con el número 1) y los resultados negativos (indicados con el número 0) de la corrida por la técnica molecular de PCR en tiempo real, aplicados en las 80 muestras obtenidas previamente de los 10 puntos muestrales durante 8 meses. Además se observa que, durante los cuatro primeros meses con ausencia de lluvia notamos 18 puntos positivos y durante los cuatro meses posteriores con presencia pluvial notamos un incremento de los positivos a 27 (20%).

**Tabla N° 9: Resultados de la Técnica Molecular de PCR en tiempo real para *Cryptosporidium parvum*, en 10 puntos muestrales del cuerpo léntico de Piuray durante el periodo Julio 2015 a Febrero 2016.**

PUNTOS DE MUESTREO	Resultados de PCR para <i>Cryptosporidium parvum</i> / MESES								
	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	Σ
PT	0	1	0	0	0	0	1	1	3
ESC	0	0	0	0	0	0	1	1	2
ENT	1	1	1	0	0	1	1	1	6
CB	1	1	1	1	1	1	1	1	8
CAP	1	1	1	0	0	1	1	1	6
PUC	0	1	0	1	0	0	0	1	3
RAV	1	0	0	0	1	0	1	1	4
OCU	0	1	0	0	0	1	1	1	4
HUI	1	1	0	1	1	1	1	1	7
SIP	0	0	0	0	0	0	1	1	2
Σ	5	7	3	3	3	5	9	10	45
	18				27				

Dónde: 0 = Negativo.

1 = Positivo.

La figura N° 19, muestra el gráfico de las curvas de amplificación para la especie *Cryptosporidium parvum*, destacando en **rojo** el control positivo, en **celeste** el control negativo, en **morado** la amplificación para el punto entrada; en **naranja** la amplificación para el punto Cuper Bajo; en **azul** la amplificación para el punto Caparay; en **fucsia** la amplificación para el punto Huilla – Huilla y en **azul metálico** la amplificación para el punto Ravilchaca, obteniéndose 5 puntos positivos en el mes de Julio 2015.

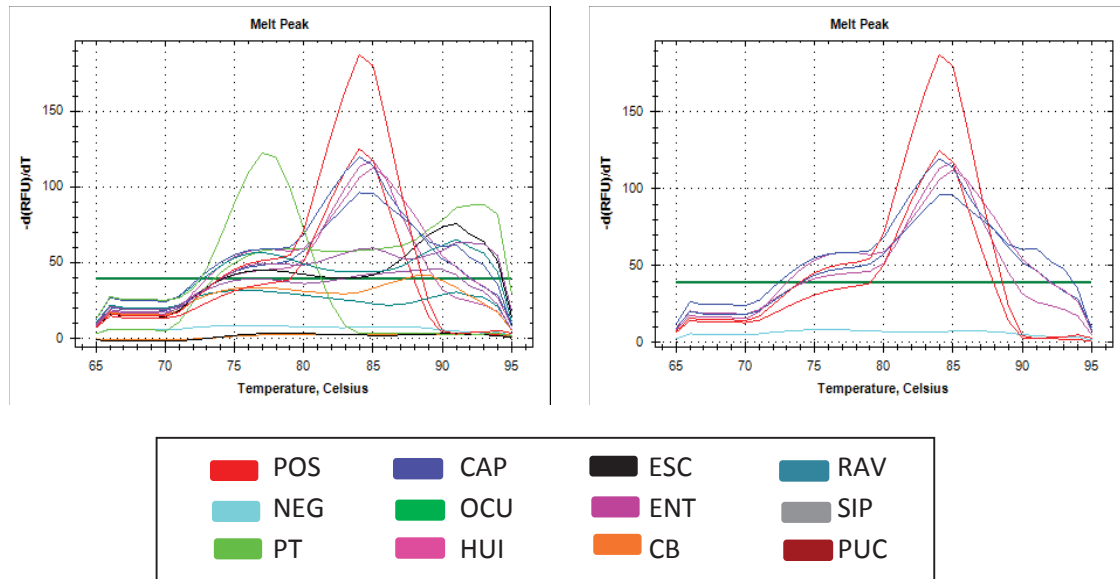
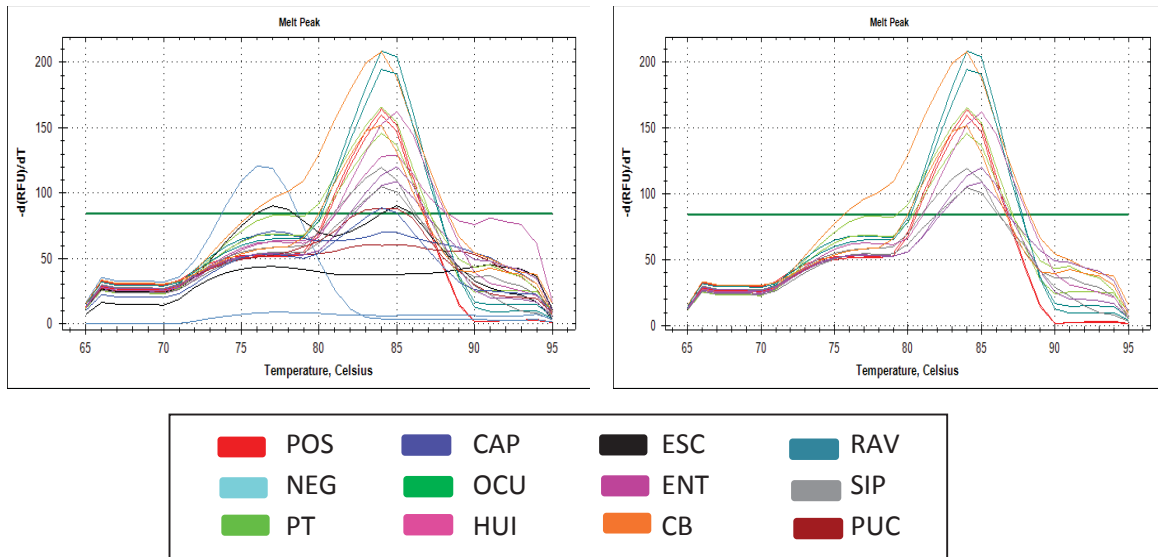


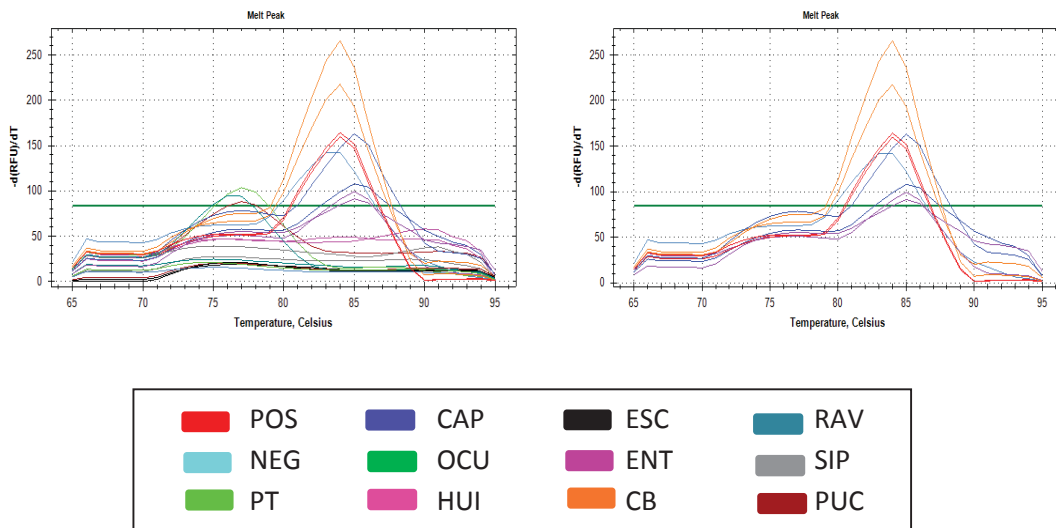
Figura N° 19 A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para *Cryptosporidium parvum*, en cada punto de muestreo del cuerpo lentic de Piuray durante el mes de Julio 2015, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos

La figura N° 20, muestra el gráfico de las curvas de amplificación para la especie *Cryptosporidium parvum*, destacando en **rojo** el control positivo, en **naranja** la amplificación para el punto Cúper Bajo, en **verde limon** la amplificación para el punto Pongobamba Tributario, en **morado** la amplificación para el punto Entrada, en **azul** la amplificación para el punto Caparay; en **verde oscuro** la amplificación para el punto Ocutuán Tributario; en **fucsia** para el punto Huilla- Huilla y en **granate** la amplificación para el punto de Pucamarca, obteniéndose 7 puntos positivos en el mes de Agosto 2015; observándose contaminación en lo tributarios que alimentan al cuerpo de agua.



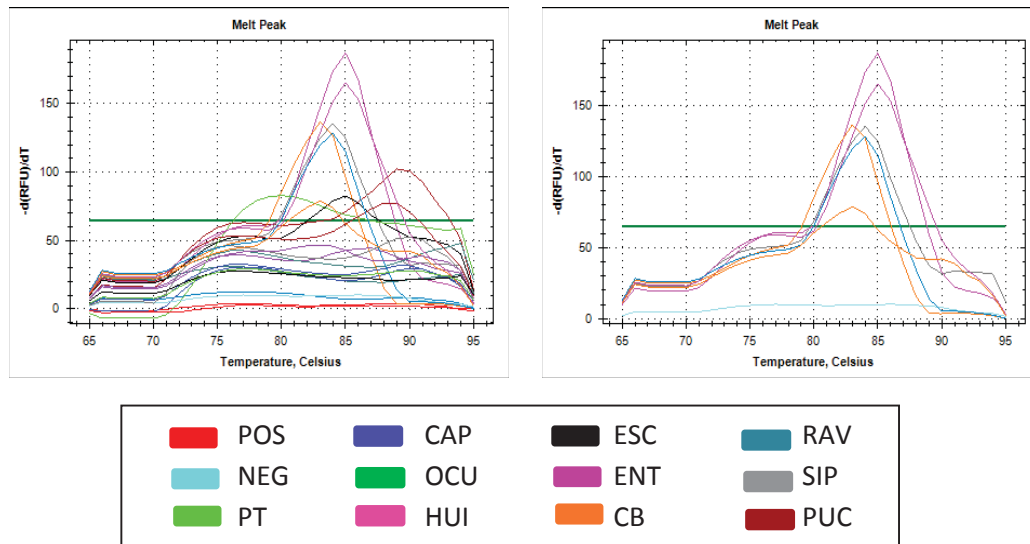
**Figura N° 20: A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para *Cryptosporidium parvum*, en cada punto de muestreo del cuerpo lentic de Piuray durante el mes de Agosto 2015, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos**

La figura N° 21, muestra el gráfico de las curvas de amplificación para la especie *Cryptosporidium parvum*, destacando en **rojo** el control positivo, en **naranja** la amplificación para el punto Cúper Bajo, en **morado** la amplificación para el punto de Entrada, y en **azul** la amplificación para el punto Caparay; obteniéndose 3 puntos positivos en el mes de Septiembre 2015.



**Figura N° 21: A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para *Cryptosporidium parvum*, en cada punto de muestreo del cuerpo lentic de Piuray durante el mes de Septiembre 2015, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos**

La figura N° 22, muestra el gráfico de las curvas de amplificación para la especie *Cryptosporidium parvum*, destacando en **rojo** el control positivo, en **celeste** el control negativo, en **fucsia** la amplificación para el punto Huilla - Huilla; en **naranja** la amplificación para el punto Cuper Bajo; y en **granate** la amplificación para el punto de Pucamarca, obteniéndose 3 puntos positivos en el mes de Octubre 2015



**Figura N° 22: A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para *Cryptosporidium parvum*, en cada punto de muestreo del cuerpo lentico de Piuray durante el mes de Octubre 2015, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos**

En la figura N° 23, muestra el gráfico de las curvas de amplificación para la especie *Cryptosporidium parvum*, destacando en **rojo** el control positivo, en **celeste** el control negativo, en **fucsia** la amplificación para el punto Huilla - Huilla; en **naranja** la amplificación para el punto Cuper Bajo; y en **azul metálico** la amplificación para el punto de Ravilchaca Tributario, obteniéndose 3 puntos positivos en el mes de Noviembre 2015; coincidiendo los puntos de Cúper Bajo y Huilla – Huilla con el mes de Octubre 2015.

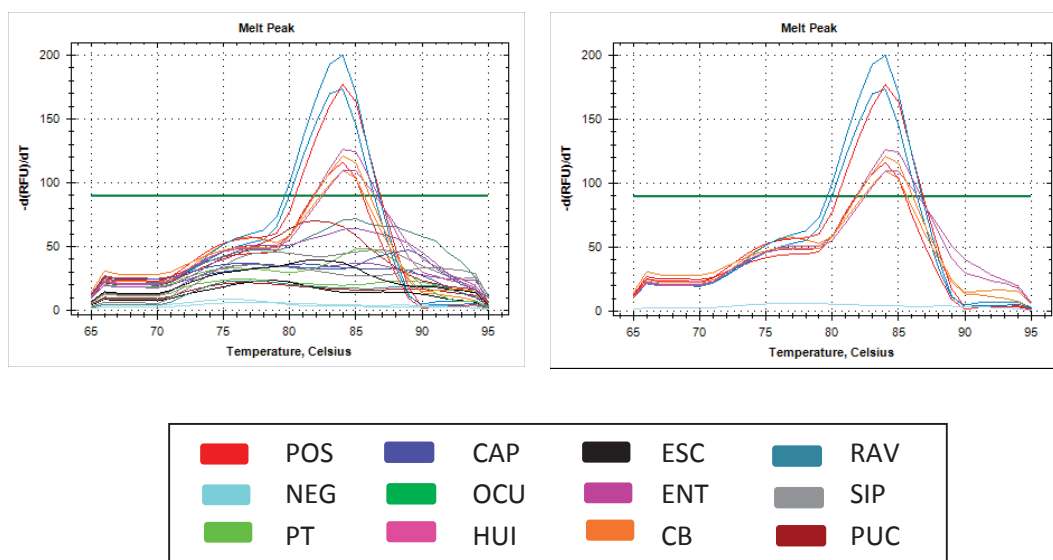


Figura N° 23: A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para *Cryptosporidium parvum*, en cada punto de muestreo del cuerpo lentic de Piuray durante el mes de Noviembre 2015, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos

La figura N° 24, muestra el gráfico de las curvas de amplificación para la especie *Cryptosporidium parvum*, destacando en **rojo** el control positivo, en **celeste** el control negativo, en **morado** la amplificación para el punto Entrada; en **naranja** la amplificación para el punto Cuper Bajo; y en **azul** la amplificación para el punto de Caparay, en **verde oscuro** la amplificación para el punto de Ocutuán Tributario y en **fucsia** la amplificación para el punto de Huilla – Huilla, obteniéndose 5 puntos positivos en el mes de Diciembre 2015; aumentando la presencia del parásito en mención.

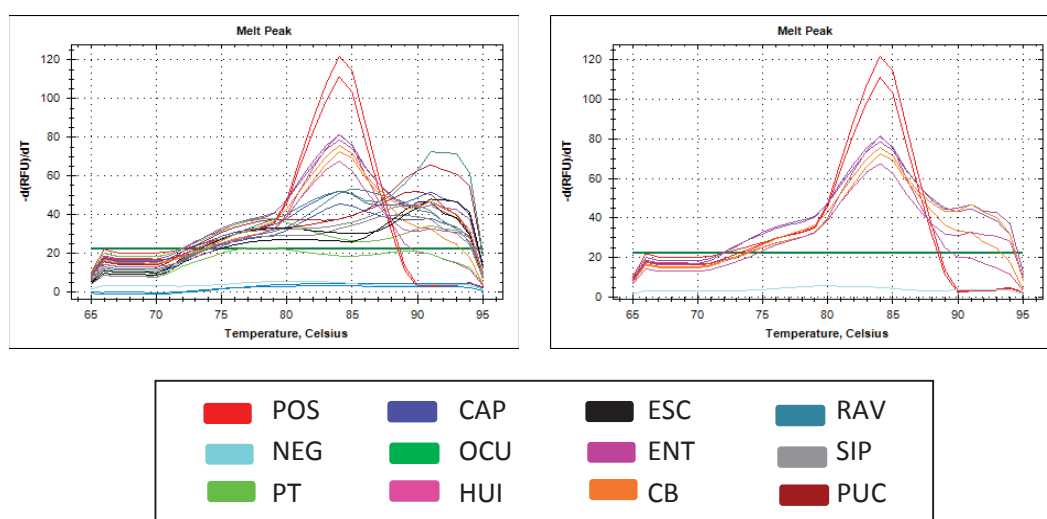
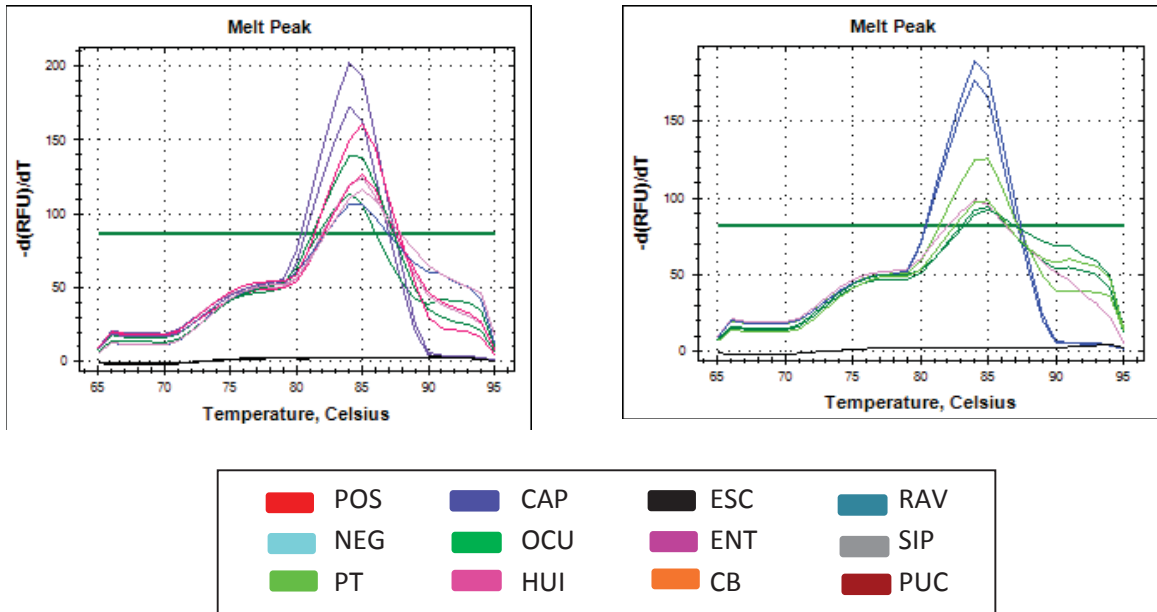


Figura N° 24: A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para *Cryptosporidium parvum*, en cada punto de muestreo del cuerpo lentic de Piuray durante el mes de Diciembre 2015, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos

En la figura N° 25, muestra que hubo amplificación de *Cryptosporidium parvum*, para todos los puntos de muestreo, menos en el punto de Pongobamba Tributaria (representado por el color **verde**) considerando en **rojo** el control positivo, en **negro** el control negativo; esto ocurrido durante el mes de Enero 2016, obteniéndose 9 puntos positivos, coincidiendo con el aumento de las precipitaciones según datos proporcionados por el SENAMHI.



**Figura N° 25: A (Izq) - Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para *Cryptosporidium parvum*, en cada punto de muestreo del cuerpo lentico de Piuray durante el mes de Enero 2016, Figura B (Der) - Distribución de los resultados positivos**

La figura N° 26, muestra que hubo amplificación de *Cryptosporidium parvum*, para todos los puntos de muestreo, considerando en **negro** el control negativo; esto ocurrido durante el mes de Febrero 2016, obteniéndose el 100% de las muestras positivas.

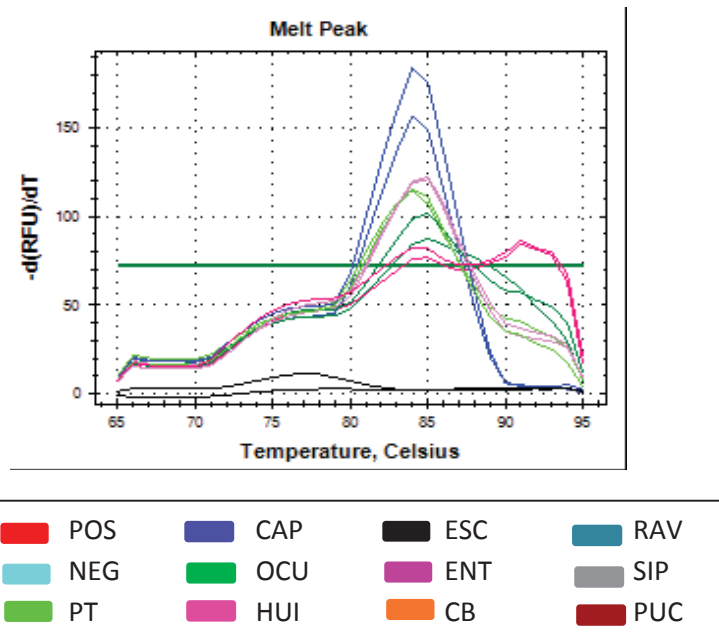


Figura N° 26: Distribución de las curvas generadas por PCR en tiempo real para *Cryptosporidium parvum*, en cada punto de muestreo del cuerpo lentic de Piuray durante el mes de Febrero 2016.

La figura N° 27 detalla los resultados positivos para *Cryptosporidium parvum*, durante los meses en ausencia de precipitación pluvial (Julio - Octubre) y los meses con presencia de precipitación pluvial (Noviembre – Febrero) teniendo en cuenta además que hubo un incremento hasta en un 100% en algunos puntos de muestreo como en Escuela (ESC) y Sipicunapampa (SIP).

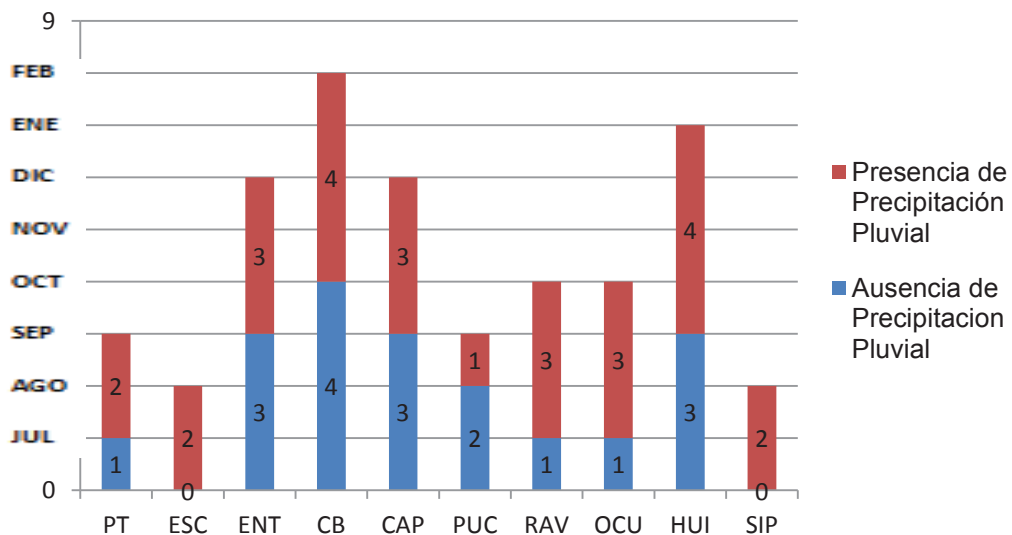


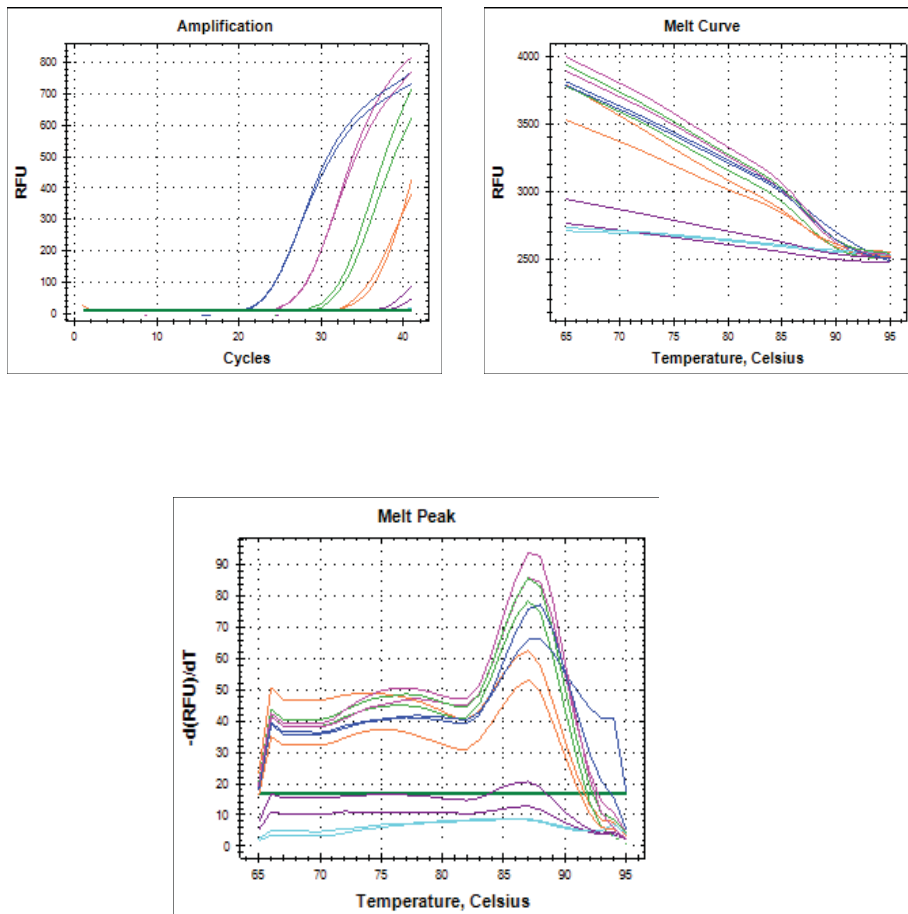
Figura N° 27: Resultados Positivos de la Prueba Molecular de PCR en tiempo real para *Cryptosporidium parvum*, obtenidos en 10 puntos muestrales del cuerpo léntico de Piuray durante 8 meses.



El punto de muestreo más crítico corresponde a Cuper Bajo (CB) ya que la presencia de *Cryptosporidium parvum* fue positiva durante todo el periodo de estudio y, comparando la frecuencia de ambos parásitos que se presentan en los puntos de Pucamarca (PUC) y Ocutuán Tributario (OCU); establecen a éstos 3 puntos como los más vulnerables a la contaminación, debido a la acción antrópica generada por la confluencia de aguas de desecho de una población puntual ubicada a unos 30 m de la periferie del cuerpo lentic y ganado pecuario circundante; Las aguas superficiales están expuestas a un gran número de factores que posibilitan la contaminación con enteroparásitos como indica Gregorio Pérez (6), corroborando con Margarita de Zumaeta (10), que afirma que los cuerpos de aguas superficiales pueden recibir descargas de aguas residuales de origen doméstico, provocando polución y la contaminación en niveles variables. En el presente trabajo de investigación, se obtuvo un 56.25% de muestras positivas a *Cryptosporidium parvum* por PCR en tiempo real, de un total de 80 muestras recolectadas, considerando que el cuerpo léntico de Piuray se encuentra a 3700 m de altitud, comparando los resultados con Díaz, M *et al.* en el año 2003; quien obtienen un 69% de muestras positivas a *Cryptosporidium sp.* en un total de 32 muestras recolectadas y a una altitud de 2100 m (2); y Thulasi Kumar *et al.* en el año 2015, quien obtiene 31.76% de muestras positivas a *Cryptosporidium parvum* en un total de 170 muestras recolectadas en el Sur Este de Asia, con altitudes que varían desde los 2500 hasta los 3 000 m.

#### **3.2.4. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL PCR EN TIEMPO REAL PARA *Giardia intestinalis*.**

Se determinó el límite de detección de la PCR para *Giardia intestinalis*, detectada por los primers en la PCR, se utilizó cuatro diluciones de 1/10 de ADN puro del parásito mencionado, siendo las concentraciones de: 19.4 ng/μl, 1.94 ng/μl, 194 pg/μl, 19.4 pg/μl, y 1.94 pg/μl, obteniendo como el límite mínimo detectable la última concentración.



**LEYENDA de DILUCIONES:**

<span style="color: blue;">■</span>	19.4 ng/μl
<span style="color: magenta;">■</span>	1.94 ng/μl
<span style="color: green;">■</span>	194 pg/μl
<span style="color: orange;">■</span>	19.4 pg/μl
<span style="color: purple;">■</span>	1.94 pg/μl

Figura N° 28: Curvas del límite de detección de *Giardia intestinalis* para PCR en tiempo real, siendo el límite mínimo de detección: 1.94 pg/μl.

### 3.2.5. PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Giardia intestinalis*.

La tabla N° 10 muestra los resultados de las muestras positivas a *Giardia intestinalis* en los diferentes puntos de muestreo durante los 8 meses de muestreo.

**Tabla N° 10: Resultados de la Técnica Molecular de PCR en Tiempo real para *Giardia intestinalis*, en 10 puntos muestrales del cuerpo léntico de Piuray durante el periodo Julio 2015 a Febrero 2016.**

PUNTOS DE MUESTREO	Resultados de PCR para <i>Giardia intestinalis</i> / MESES								
	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	Σ
PT	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENT	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CB	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAP	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PUC	0	0	0	0	0	0	0	1	1
RAV	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OCU	0	0	0	0	0	0	0	1	1
HUI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SIP	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Σ	0	0	0	0	0	0	0	2	2

Dónde: 0 = Negativo.

1 = Positivo.

En el figura N° 29, se muestra la curva de amplificación obtenida en el mes de Febrero, debido a que este mes fue el único que presentó resultados positivos; destacando en **rojo** el control positivo, en **azul** el control negativo, en **celeste**, los resultantes positivos del punto Ocutuán, y en **morado**, los resultantes positivos del punto Pucamarca para la especie *Giardia intestinalis*.

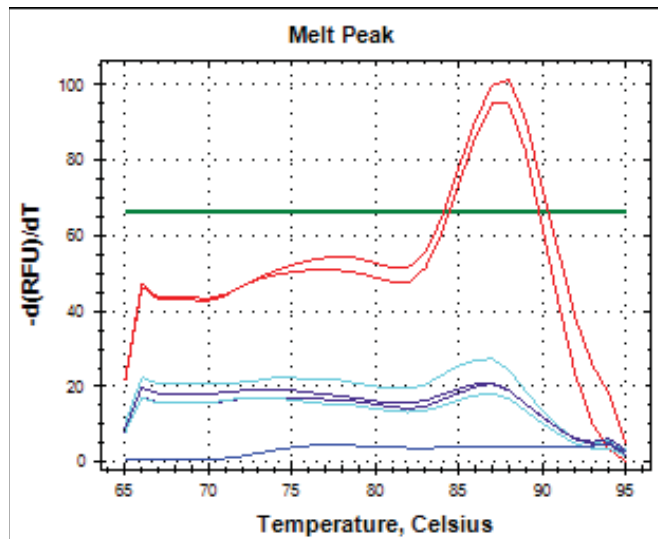


Figura N° 29: Curvas de resultados por PCR en tiempo real de *Giardia intestinalis* durante el mes de Febrero 2016 en muestras del cuerpo lentico de Piuray.

Asher y colab en el 2011 (75), evaluaron varios protocolos publicados para el 18S ARN ribosomal de la subunidad pequeña, para la detección de *Giardia intestinalis* en muestras fecales, con un tasa de éxito del 90%.

Para la presente investigación, se usaron primers que amplifican la secuencia 18S rRNA de ambas especies. Autores como E. Stroup *et al.* en el 2006 (76), utilizan primers para amplificar el gen 18S de *Cryptosporidium parvum* en muestras de heces de humanos mediante PCR en tiempo real con el uso de sondas Scorpion; por otro lado Rochelle P *et al.* en 1997 (15), utilizaron *PCR Multiplex* para la detección simultánea de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.*, demostrando la utilidad potencial de PCR para la detección de protozoos patógenos en el agua; y mencionando la necesidad de un desarrollo continuo.

En el presente trabajo de investigación, la prueba de PCR combinada con la lisis, extracción, amplificación, ha demostrado muy buenos resultados en la detección de protozoarios patógenos como *Cryptosporidium parvum* y *Giardia intestinalis*, ya que la PCR por su alta sensibilidad y especificidad e incluso un óptimo límite de detección, es aplicable al diagnóstico de estas formas parasitarias de importancia en la salud pública.

### 3.3. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR PRUEBAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA Y PCR EN TIEMPO REAL.

**Tabla N° 11: Resultados de las pruebas empleadas para el diagnóstico de *Cryptosporidium*, durante los meses de ausencia y presencia de lluvias en cada punto de muestreo.**

MESES	SHEATHER - KINYOUN: <i>Cryptosporidium sp.</i>										PCR EN TIEMPO REAL : <i>Cryptosporidium parvum</i> .									
	PT	ESC	ENT	CB	CAP	PUC	RAV	OCU	HUI	SIP	PT	ESC	ENT	CB	CAP	PUC	RAV	OCU	HUI	SIP
JUL	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
AGO	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0
SEP	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
OCT	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
NOV	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
DIC	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
ENE	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
FEB	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

En la tabla número 11 se observó que por la técnica de Sheather – Kinyoun hubo resultados positivos frente al diagnóstico negativo por PCR y viceversa, el primer caso es debido a la alta especificidad del PCR en tiempo real, el cual, reconoce sólo a *Cryptosporidium parvum*, especie de importancia para la salud pública, debido a los primers utilizados, pudiendo estar presente alguna otra especie de *Cryptosporidium sp.*, por otro lado; la alta sensibilidad del PCR en tiempo real, tiene como ventaja detectar cantidades mínimas de ADN de la especie en estudio (*Cryptosporidium parvum*) en comparación de las técnicas de certeza parasitológica, que nos sirven para una conocimiento general de la muestra a estudiar; coincidiendo con Aguilera P *et al.* (60) quienes concluyen que, la PCR en tiempo real se vincula totalmente en el diagnóstico de enfermedades, estudios epidemiológicos, estudios forenses, **determinaciones de la calidad de agua y/o aire**, alimentos, estudios genéticos y, por supuesto, en la investigación básica. Al ser una herramienta poderosa para el análisis de abundancia o presencia de los ADN específicos, es necesario contar con un diseño experimental adecuado que optimice su sensibilidad. En estos ensayos hay que incorporar todos los controles necesarios, así como asegurar la especificidad de los productos de amplificación, rendimiento y el rango de detección, para asegurar resultados satisfactorios.

**Tabla N° 12: Resultados de las pruebas empleadas para el diagnóstico de *Giardia* durante los meses de ausencia y presencia de lluvias en cada punto de muestreo.**

MESES	SHEATHER - LUGOL DOBELL O'CONNOR <i>Giardia</i> sp.										PCR EN TIEMPO REAL <i>Giardia intestinalis</i>									
	PT	ESC	ENT	CB	CAP	PUC	RAV	OCU	HUI	SIP	PT	ESC	ENT	CB	CAP	PUC	RAV	OCU	HUI	SIP
JUL	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AGO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEP	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OCT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NOV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DIC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FEB	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0

En la tabla número 12 se observa que la técnica de Sheather – Lugol parasitológico Dobell & O'Connor hubo resultados positivos frente al diagnóstico negativo por PCR y viceversa, la alta especificidad del PCR en tiempo real reconoce sólo a *Giardia intestinalis*, esto debido a los primers utilizados, pudiendo estar presente alguna otra especie de *Giardia* sp., cómo *G. ardeae*, *G. psittaci*, de origen aviar, debido a la presencia de aves endémicas, que están en contacto directo con el agua de Piuray, así como *G. muris* y *G. agilis* (roedores y anfibios respectivamente) visualizados en las pruebas de certeza parasitológica, contrastando con Marshall *et al.* (38) quienes afirman que en contraste con la población general, la alta o baja prevalencia de *Giardia intestinalis* descrita, parece ser más común en las zonas urbanas que en las poblaciones rurales; por otro lado Rivera M *et al.* (41), afirman que la mayor prevalencia se encuentra en zonas tropicales y subtropicales, donde afecta hasta el 30% de los adultos; además siendo el entorno del cuerpo léntico de Piuray de utilización agrícola y por lo tanto receptor de abonos, pesticidas entre ellos los órganos clorados que constituyen la primera clase de plaguicidas y antiparasitarios descubiertos en el siglo XX, como el Dieldrin 76\* y Lindano 80-125\*, que a pesar de las prohibiciones aún se sigue utilizando, pudiese este haber contribuido a la falta de *Giardia intestinalis* en el entorno de estudio o que la población circundante tenga una frecuencia muy baja de este protozoo (77).

### 3.4. DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE *Cryptosporidium parvum* y *Giardia intestinalis* POR PCR EN TIEMPO REAL.

En la figura N° 30, se muestra los resultados positivos de las 80 muestras expresado en frecuencia; *Cryptosporidium parvum* se presentó en los puntos muestrales de Cuper Bajo (CB) con 100%, Huilla- Huilla (HUI) con 87.5%, Entrada (ENT) con 75% al igual que Caparay. Los puntos de Pucamarca (PUC) y Ocutuán (OCU) son los puntos que presentaron ambas especies: *Cryptosporidium parvum* y *Giardia intestinalis*.

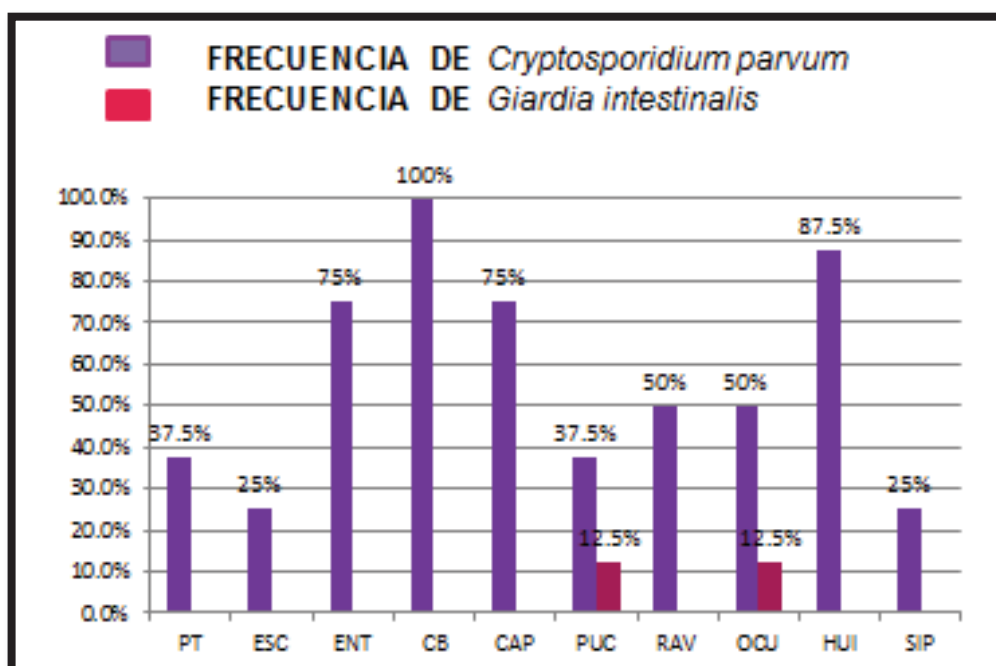


Figura N° 30: Distribución la frecuencia de los resultados positivos de *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium parvum* obtenidos por PCR en tiempo real, aplicado en los puntos de muestreo del cuerpo de agua lentico de Piuray en el periodo de Julio 2015 a Febrero 2016.

Los resultados del presente estudio (56.25%) difieren a los reportados por Bajer A *et al.* (20), que muestran *Cryptosporidium parvum* en el 85% de las muestras de aguas superficiales, y respecto a *Giardia sp.*, que halló el 61% en comparación con el presente estudio (2.5%). Adamska M. (22) y Thulasi Kumar *et al.* (21) confirmaron la presencia de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia sp.*, por PCR en tiempo real, tal como se evidenció en el presente estudio y según Rochelle P *et al.* (15) se concluyó que el PCR en tiempo real demuestra su utilidad potencial para la detección de protozoos patógenos en el agua.

El ooquiste de *Cryptosporidium parvum* soporta temperaturas bajas de hasta - 22 °C por 18 meses (46), es 30 veces más resistente al ozono y 14 veces más resistente al dióxido de cloro, en comparación al quiste de *Giardia intestinalis* que soporta de 4 a 8°C (5) por tres meses en agua, y hasta 3 ppm de cloro libre, hacen de esta especie mucho menos resistente que *Cryptosporidium parvum*; y en vista de que, en el área de estudio se tiene una media de temperatura de 3.2°C en julio y una máxima de 25.17°C en el mes de octubre, es debido a este factor, al cual probablemente *Giardia intestinalis*, haya presentado menor frecuencia que *Cryptosporidium parvum*.

### **3.3. APLICACIÓN DE LA PRUEBA ESTADÍSTICA t- STUDENT DE LOS RESULTADOS POSITIVOS POR PCR PARA *Cryptosporidium parvum*.**

#### **3.3.1. APLICACIÓN DE LA PRUEBA ESTADÍSTICA t - STUDENT PARA EVALUAR DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DE LA PRESENCIA DE *Cryptosporidium parvum* EN LOS MESES CON AUSENCIA Y PRESENCIA DE LLUVIA.**

En la tabla 13 se muestra los promedios de la presencia de *Cryptosporidium parvum* por la PCR en tiempo real, divididos en ausencia y presencia de lluvia a la cual se aplicó la prueba estadística t – student, para establecer igualdad o diferencia entre los promedios provenientes de una misma muestra obtenidos en dos momentos diferentes (ausencia y presencia de lluvia).

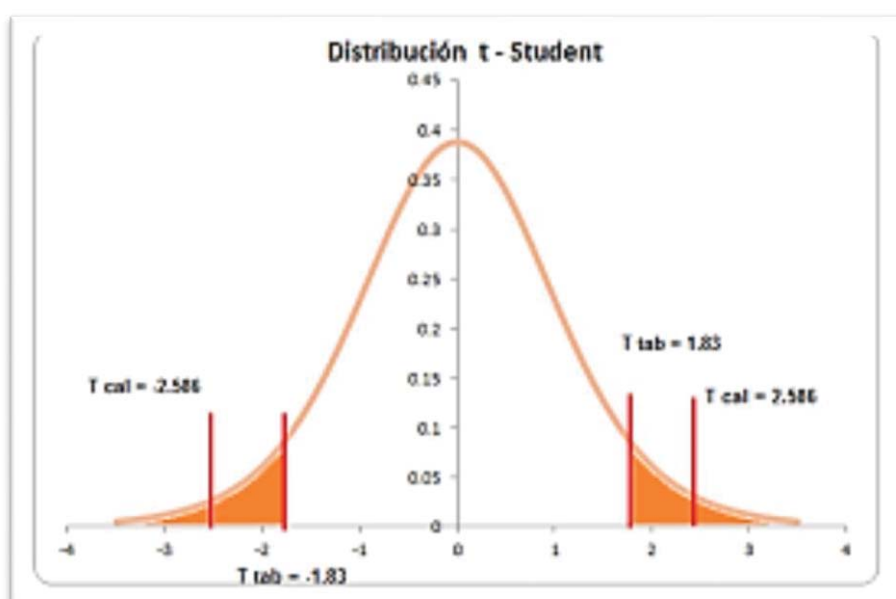
**Tabla N° 13: Promedios de la presencia de *Cryptosporidium parvum* en los meses con ausencia y presencia de lluvia.**

<b>PUNTOS DE MUESTREO</b>	<b>Ausencia de Lluvias</b>	<b>Presencia de Lluvias</b>
<b>PT</b>	1	2
<b>ESC</b>	0	2
<b>ENT</b>	3	3
<b>CB</b>	4	4
<b>CAP</b>	3	3
<b>PUC</b>	2	1
<b>RAV</b>	1	3
<b>OCU</b>	1	3
<b>HUI</b>	3	4
<b>SIP</b>	0	2
<b>Σ</b>	<b>18</b>	<b>27</b>



**Tabla N° 14: Prueba de t - Student para evaluar la diferencia significativa de la presencia de *Cryptosporidium parvum* en los meses con ausencia y presencia de lluvia.**

<i>Prueba t - Student</i>	<i>Periodo Sin Lluvia</i>	<i>Periodo de Lluvias</i>
Media	1.8	2.7
Varianza	1.9556	0.9
Observaciones	10	10
Coeficiente de correlación de Pearson	0.6198	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	-2.5861	
P(T<=t) una cola	0.0147	
Valor crítico de t (una cola)	1.8331	
P(T<=t) dos colas	0.0294	
Valor crítico de t (dos colas)	2.2622	



**Figura N° 31: Distribución de t - Student para evaluar la diferencia significativa de la presencia de *Cryptosporidium parvum* en los meses con ausencia y presencia de lluvia.**

Dónde:

**Ho:** No hay diferencia significativa de la presencia de *Cryptosporidium parvum* durante los meses de ausencia y presencia de lluvia.

**Ha:** Existe diferencia significativa de la presencia de *Cryptosporidium parvum* durante los meses de ausencia y presencia de lluvia.

Si:

$T_{tab} < T_{cal}$  se acepta la hipótesis alterna.

La prueba estadística rechaza la Hipótesis nula y acepta la Hipótesis alterna lo que indica que si existe una diferencia significativa entre los meses de ausencia y presencia de lluvia.

Durante los meses de Enero y Febrero se observó un incremento de *Cryptosporidium parvum* hasta en casi un 50%, esto debido al aumento de precipitaciones por ser una época característica del entorno, coincidiendo lo dicho por Yezid Solarte *et al.* (31), que la velocidad de sedimentación de los parásitos, la inversión térmica, el burbujeo de gases desde la capa bentónica y las perturbaciones propias causadas por el transporte de sedimentos de fuera hacia dentro de las lagunas durante la época de precipitaciones, son los factores más importantes para la incrementación de éstos agentes nosológicos (31). Realizada la estadística mediante la prueba t-student, se aceptó la hipótesis alterna; es decir, se tiene una diferencia estadísticamente significativa; demostrado biológicamente por las pruebas de certeza parasitológica y PCR en tiempo real.

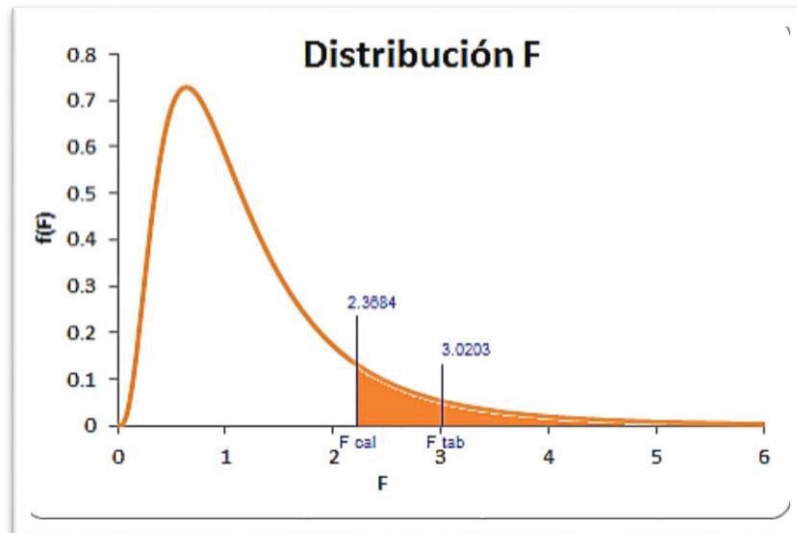
### 3.3.2. APLICACIÓN DE LA PRUEBA ESTADÍSTICA DE ANOVA PARA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DE LA PRESENCIA DE *Cryptosporidium parvum* EN LOS DIFERENTES PUNTOS DE MUESTREO.

**Tabla N° 15: Promedios positivos a *Cryptosporidium parvum* por PCR en tiempo real de los puntos de muestreo frente a la ausencia y presencia de lluvia.**

	PT	ESC	ENT	CB	CAP	PUC	RAV	OCU	HUI	SIP
<b>SECAS</b>	1	0	3	4	3	2	1	1	3	0
<b>LLUVIAS</b>	2	2	3	4	3	1	3	3	4	2
<b>Σ</b>	3	2	6	8	6	3	4	4	7	2

**Tabla N° 16: Análisis de Varianza ANOVA para evaluar diferencia significativa de la presencia de *Cryptosporidium parvum* en los diferentes puntos de muestreo.**

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	20.25	9	2.25	2.3684	0.0977	3.0204
Dentro de los grupos	9.5	10	0.95			
Total	29.75	19				



**Figura N° 32: Distribución Anova para evaluar la diferencia significativa de la presencia de *Cryptosporidium parvum* en los diferentes puntos de muestreo**

Dónde:

**Ho:** No hay diferencia significativa de la presencia de *Cryptosporidium parvum* en los puntos de muestreo.

**Ha:** Existe diferencia significativa de la presencia de *Cryptosporidium parvum* en los puntos de muestreo.

Si:

$F_{tab} > F_{cal}$  se acepta la hipótesis nula

La prueba estadística acepta la Hipótesis nula y rechaza la Hipótesis alterna lo que indica que no existe una diferencia significativa de la presencia de *Cryptosporidium parvum* en los diferentes puntos de muestreo.

La presencia de *Cryptosporidium parvum*, no depende del punto de muestreo, lo cual es confirmado por la prueba estadística de ANOVA. La presencia *Cryptosporidium parvum* está relacionada con la contaminación antrópica del entorno del cuerpo de agua; lo cual es corroborado por M. Zumaeta (10), donde la técnica de PCR en tiempo real, demuestra su especificidad, sensibilidad y eficiencia al diagnóstico de *Cryptosporidium parvum*, especie típica de humanos y que los humanos comparten con los animales (78).

## CONCLUSIONES:

1. Se determinó *Cryptosporidium* sp. por la técnica de certeza parasitológica Sheather - coloración Kinyoun.
2. Se determinó *Giardia* sp. por la técnica de certeza parasitológica Sheather – Lugol Dobell & O'Connor,
3. Se extrajo ADN de las muestras obtenidas del cuerpo léntico de Piuray, con un rango de concentración entre 9.9 - 75.1 ng/μL y un rango de pureza que va del 1.80 - 2.98.
4. Se estandarizó la PCR en tiempo real para *Cryptosporidium parvum*, utilizando primers que amplifican la secuencia del gen 18S, con una frecuencia del 56.25% positivos en un total de 80 muestras.
5. Se estandarizó la PCR en tiempo real para *Giardia intestinalis*, utilizando primers que amplifican la secuencia del gen 18S, con una frecuencia del 2.5% positivos en un total de 80 muestras.
6. Se demostró que existe diferencia significativa entre los meses de ausencia y presencia de lluvia para la concurrencia de *Cryptosporidium parvum*, habiendo 20% más de resultados positivos en presencia de lluvia.
7. Se demostró que no existe una diferencia significativa para la presencia de *Cryptosporidium parvum* en los diferentes puntos de muestreo, lo cual muestra que existe contaminación con este parásito en la periferia del cuerpo léntico de Piuray.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda:

1. Prevenir a la población de la presencia de los 2 patógenos *Cryptosporidium parvum* y *Giardia intestinalis*, y que les permitan conocer las consecuencias de la Criptosporidiosis y Giardiosis.
2. Conocer y caracterizar la presencia de otras especies de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.*, a través de pruebas moleculares, e investigar otros tipos de parásitos patógenos para el humano.
3. Encausar las aguas residuales de los puntos Cuper Bajo y Pucamarca ya que estos son los principales contaminantes.
4. Efectuar el control de calidad parasitológico de aguas, debería por técnica directa, periódicamente.
5. Informar los resultados obtenidos para optimizar los procesos del sistema de tratamientos para mejorar la calidad del agua, ya que gestionar los recursos hídricos puede impulsar el crecimiento económico del país y contribuir en gran medida a la reducción de la pobreza.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, et al. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*. 2004;304(5669):441-5.
2. Díaz-Cinco ME, Leyva-Michel EE, Mata-Haro V, González-Ríos H. Incidencia y viabilidad de *Cryptosporidium parvum* en el agua potable de ciudad Obregón, Sonora, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2011;19(2):6.
3. Betancourt W Q QLJ. Parásitos protozoarios entéricos en ambientes acuáticos: métodos de concentración y detección. . Sistema de Información Científica Redalyc  
  
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. 2016;33(Venezuela ): 418-23.
4. Alparo Herrera I. Giardiasis y desnutrición. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*. 2005;44:166-73.
5. Alarcón MA, Beltrán M, Cárdenas ML, Campos MC. Recuento y determinación de viabilidad de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. En aguas potables y residuales en la cuenca alta del río Bogotá. *Biomédica*. 2005;25:353-65.
6. Pérez-Cordón G, Rosales MJ, Valdez RA, Vargas-Vásquez F, Cordova O. Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2008;25:144-8.
7. Carmena D, Aguinagalde X, Zigorraga C, Fernandez-Crespo JC, Ocio JA. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *Journal of applied microbiology*. 2007;102(3):619-29.
8. SUNASS SNdSdS. Determinación de la Fórmula Tarifaria, Estructura Tarifaria y Metas de Gestión Aplicables a la Empresa de Servicio de Agua Potable y Alcantallirado SEDACUSCO S.A. - Estudio Tarifario. Lima, Perú.: Junio, 2013.
9. Amésquita Mancilla S. Evaluación Biológica de Macroinvertebrados acuáticos como organismos indicadores de la calidad de agua en la Laguna de Piuray. Cusco, Perú.: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.; 2011.
10. Ada BM, Aurazo de Zumaeta M, De Vargas L, Maldonado Yactayo V. Tratamiento de agua para consumo humano: Plantas de filtración rápida. Manual I: Teoría. Ambiente CPdISyCd, editor. Lima, Perú: CEPIS; 2004.
11. Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua, aprobados por Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM, (2008).
12. Legislación Medio Ambiental DS N° 015-2015-MINAM, Modificación de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua, aprobados por Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM, DS N° 015-2015-MINAM (2015).
13. Prevention CfDCa. Parasites - *Giardia* CDC2015 [cited 2016 27 de Abril]. Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/pathogen.html>.
14. Baruch WLA. Parasitología Humana. Interamericana MH, editor. México D.F: McGraw Hill Education; 2012.
15. Rochelle PA, De Leon R, Stewart MH, Wolfe RL. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum*

and Giardia lamblia in water. Applied and environmental microbiology. 1997;63(1):106-14.

16. American-Public-Health-Association. Drinking Water Quality and Public Health Estados Unidos: APHA; 2009 [cited 2016 05 Mayo ]. Available from: <https://www.apha.org/policies-and-advocacy/public-health-policy-statements/policy-database/2014/07/14/13/22/drinking-water-quality-and-public-health-position-paper>.

17. Abramovich BL, Gilli MI, Haye MA, Carrera E, Lura MC, Nepote A, et al. [Cryptosporidium y Giardia in surface water]. Rev Argent Microbiol. 2001;33(3):167-76.

18. Luna S, Reyes L. L, Chinchilla M, Catarinella G. Presencia de ooquistes de Cryptosporidium spp en aguas superficiales en Costa Rica. Parasitología latinoamericana. 2002;57:63-5.

19. GEPAMOL Gdl. Detección y Viabilidad de quistes de Giardia sp, Blastocystis sp y ooquistes de Cryptosporidium sp en el sistema de agua potable y agua no potable del municipio de Ar,enia, Quindio. Colombia: Universidad del Quindio.; 2012.

20. Bajer A, Toczylowska B, Bednarska M, Sinski E. Effectiveness of water treatment for the removal of Cryptosporidium and Giardia spp. Epidemiology and infection. 2012;140(11):2014-22.

21. Kumar T, Majid MA, Onichandran S, Jaturas N, Andiappan H, Salibay CC, et al. Presence of Cryptosporidium parvum and Giardia lamblia in water samples from Southeast Asia: towards an integrated water detection system. Infectious diseases of poverty. 2016;5(1):3.

22. Adamska M. Molecular characterization of Cryptosporidium and Giardia occurring in natural water bodies in Poland. Parasitology research. 2015;114(2):687-92.

23. Medeiros RC, Daniel LA. Comparison of selected methods for recovery of Giardia spp. cysts and Cryptosporidium spp. oocysts in wastewater. Journal of water and health. 2015;13(3):811-8.

24. Manual: Identificación y cuantificación de enteroparásitos en aguas residuales, (1993).

25. Cairo G. Evaluación de componentes biológicos y físico – químicos en el Sistema de Abastecimiento de Agua Jaquira – Cusco. Cusco, Perú: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2014.

26. Del Coco VF, Córdoba MA, Basualdo JA. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. Revista argentina de microbiología. 2009;41:185-96.

27. Aguirre García M, Ambrosio Hernandez J, Berrecil Flores M, Berrecil Flores E, Bécker Fauser I, Bonilla Lemus P, et al. Parasitología Médica de las Moléculas a la Enfermedad. Interamericana M-H, editor. México D.F: McGraw-Hill Interamericana; 2004.

28. Chacín-Bonilla L. Cryptosporidium: Filogenia y taxonomía. Investigación Clínica. 2007;48:1-4.

29. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification. International journal for parasitology. 2000;30(12-13):1305-22.

30. Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of Cryptosporidium parvum and Cryptosporidium hominis oocyst. Water research. 2004;38(4):818-62.



31. Yezid S, Miguel P, Carlos M. Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. *Colombia Médica*. 2006;37(N° 1):75 - 82.
32. Chen XM, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF. Cryptosporidiosis. *The New England journal of medicine*. 2002;346(22):1723-31.
33. Carmen MTGd. Diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. Mediante tinción de Ziehl-Neelsen y Auramina en heces de terneros diarreicos de predios lecheros de la provincia de Valdivia Valdivia, Chile.: Universidad Austral de Chile.; 2011.
34. Basualdo J, Pezzani B, De Luca M, Cordoba A, Apezteguia M. Screening of the municipal water system of La Plata, Argentina, for human intestinal parasites. *International journal of hygiene and environmental health*. 2000;203(2):177-82.
35. Spano F, Crisanti A. *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. *International journal for parasitology*. 2000;30(4):553-65.
36. Carcamo C, Hooton T, Wener MH, Weiss NS, Gilman R, Arevalo J, et al. Etiologies and manifestations of persistent diarrhea in adults with HIV-1 infection: a case-control study in Lima, Peru. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(1):11-9.
37. M CdC, A RVF. *Parasitología Veterinaria*. S.A.U M-H-IdE, editor. Madrid1999.
38. Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(1):67-85.
39. Cabello RR, Benavente IFH. Síndrome diarreico infeccioso: Editorial Medica Panamericana Sa de; 2002.
40. Berenguer JG. *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona*; 2007.
41. Rivera M, de la Parte MA, Hurtado P, Magaldi L, Collazo M. Giardiasis Intestinal. Mini-Revisión. *Investigación Clínica*. 2002;43:119-28.
42. J.L P-A, Carranza-Rodríguez C, Vicente Santiago B, Muroc A. Amebosis, Giardosis y Tricomonosis *Medicine*. 2010;10(54):10-2.
43. Luis F. *Giardiasis entre Realidades y Mitos BVSCUBA Libros de Autores Cubanos: Gustavo Kourí Flores; 2009 [cited 2016 16 Mayo 2016]. Available from: <http://gsdl.bvs.sld.cu/cgi-bin/library?e=d-00000-00---off-0clnicos--00-0---0-10-0---0---0direct-10---4-----0-1l--11-es-50---20-help---00-0-1-00-0-0-11-1-0utfZz-8-00&a=d&c=clnicos&cl=CL3.8&d=HASH220e8553fb2ee75918416c.1>*.
44. Jerlstrom-Hultqvist J, Franzen O, Ankarklev J, Xu F, Nohynkova E, Andersson JO, et al. Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. *BMC genomics*. 2010;11:543.
45. Lujan HD, Svärd S. *Giardia: A Model Organism*: Springer Vienna; 2011.
46. Korich DG, Mead JR, Madore MS, Sinclair NA, Sterling CR. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and environmental microbiology*. 1990;56(5):1423-8.
47. Barbosa J, Espinar MJ, Gonçalves Rodrigues A, Pina-Vaz C. *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* y *Encephalitozoon intestinalis*, oportunistas emergentes. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 2013;53:117-24.

48. Muller N, von Allmen N. Recent insights into the mucosal reactions associated with Giardia lamblia infections. International journal for parasitology. 2005;35(13):1339-47.
49. J. TZ. Microbiología y Parasitología Médicas. Editores M, editor. México D.F.1993.
50. Helen Sea. Atlas of Medical Parasitology 2004 [cited 2016 15 mayo 2016]. Available from: <http://www.biosci.ohiostate.edu/parasite/giardia.html>.
51. Zárate R D, Chávez V A, Casas A E, Falcon P N. Prevalencia de Giardia sp. en canes de los distritos del cono sur de Lima Metropolitana. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2003;14:134-9.
52. Salud OMD. Agua: Organización Mundial de la Salud.; Junio del 2015 [cited 2016 16 de Mayo]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/es/>.
53. Alberto RRJ. Calidad del Agua. Ingeniería ECd, editor. Colombia: Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería; 2005. 461 p.
54. Vercellone EZM, M. Z. Agua de Consumo, Coadyuvante de Parasitosis Intestinales en poblaciones Vulnerables de la Ciudad de Villa Constitución ¿Inequidad o Iniquidad? 2001.
55. Mahdavi Poor B, Rashedi J, Asgharzadeh M, Fallah E, Hatam-Nahavandi K, Dalimi A. Molecular Characterization of Cryptosporidium Species in Children with Diarrhea in North West of Iran. International journal of molecular and cellular medicine. 2015;4(4):235-9.
56. Real-time PCR Handbook, (2012).
57. Tamay de Dios L IC, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real Investigación en Discapacidad. 2013:70-8.
58. Clark DP. Molecular Biology: Academic Cell Update. Library B, editor. California, USA: Elsevier; 2010.
59. Alberdi M-B, Batra A, Bauer P, Beckers S, Beld M, Bollwein M, et al. Light Cycler Real-Time pcr Systems Application Manual. LightCycler® 480 Instruments and Additional Products: 2010.
60. Penélope A, Martha RT, Graciela RMM, Benjamín PO, Elena CCM. PCR en Tiempo Real [PDF]. 2011 [cited 2016 25 Marzo]. Available from: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/pcrtiempo.pdf>.
61. Lab. Q. Critical Factors for Successful Real-Time PCR. 2010.:64.
62. Brand TFS. Real - time PCR handbook. Estados Unidos: Roche Molecular Systems; 2014.
63. Luisa CLM. Estudio mineralógico de los suelos agrícolas por espectroscopía Mossbauer. Lima, Perú.: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002.
64. Zumaeta Md. Observaciones de campo y muestreo puntual en la Laguna de Piuray, Cusco - Programa de Control de Calidad y Desarrollo de Laboratorios. 1998;l.
65. Servicio-Nacional-de-Metereología-e-Hidrología-del-Peru. Boletines Regional Cusco 2016 [cited 2016 3 Junio 2016]. Available from: <http://www.senamhi.gob.pe/?p=0701>.
66. Muñiz Pareja F. Manual de Procedimientos de Parasitología. 2014. 2014.
67. Arnedo IB, Mariangela ;Díaz-Suárez, Odélis y Botero, Ligia. Técnicas para la detección de Cryptosporidium sp. en Sistemas de Tratamiento de Agua Residual. Kasmera. 2008;36(2):120 - 8.

68. Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de los Parásitos Intestinales del Hombre, Serie de Normas Técnicas (2003).
69. A JC, A. M-MC, César Z-A. Comparación de las técnicas de Willis y de Sheather para el diagnóstico coproparasitológico [PDF]. Universidad Nacional de Trujillo, Perú; 2006 [cited 2016 25 Marzo 2016]. Available from: file:///C:/Users/DELL/Downloads/Comparaci%C3%B3n%20de%20las%20T%C3%A9cnicas%20de%20Willis%20y%20de%20sheather%20(3).pdf.
70. F. DCV, Córdoba MA, A. BJ. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Rev Argent Microbiol.* 2009 41(3).
71. Basso WU, Lucila V, Risso MA. Comparacion de tecnicas parasitologicas para el examen de heces de perro. *Parasitología al Dia.* 1998;22:52-6.
72. Mag-Bind Soil DNA kit Manual, (2014).
73. biosystems LT-A. SYBR® Green PCR Master Mix and SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit. *Rev G.* Septiembre 2011; 4309155 (Master Mix) y 4306736 (RT-PCR Reagents Kit).
74. Prevention CfDca. Compendium of Measures to Prevent Disease Associated with Animals in Public Settings, 2011  
Morbidity and Mortality Weekly Report. May 6, 2011.
75. Asher AJ, Waldron LS, Power ML. Evaluation of a PCR protocol for sensitive detection of *Giardia intestinalis* in human faeces. *Parasitology research.* 2012;110(2):853-8.
76. Stroup SE, Roy S, McHele J, Maro V, Ntabaguzi S, Siddique A, et al. Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using Scorpion probes. *Journal of medical microbiology.* 2006;55(Pt 9):1217-22.
77. P J. Organoclorados para uso Veterinario como Antiparasitarios para el control de parásitos del ganado, caballos, perros y gatos *Parasitipedia.net* 2016 [updated 05/02/2016; cited 2016 29/06]. Available from: [http://parasitipedia.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=393&Itemid=472](http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=393&Itemid=472).
78. Cabada MM, White AC, Jr. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? *Current opinion in infectious diseases.* 2010;23(5):494-9.

***ANEXOS***

**RESULTADOS OBTENIDOS MENSUALMENTE POR LAS TÉCNICAS DE  
CERTEZA PARASITOLÓGICA Y PCR EN TIEMPO REAL.**

**Tabla N° 17: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Julio 2015  
para *Cryptosporidium sp.*, y *Giardia sp.***

JULIO						
<i>Cryptosporidium sp.</i>				<i>Giardia sp.</i>		
PUNTOS DE MUESTREO	Sheather – Kinyoun	PCR <i>Cryptosporidium parvum</i>	TM obtenidos para <i>C. parvum</i>	Shether - Lugol Dobell & O'connor	PCR <i>Giardia intestinalis</i>	TM obtenidos para <i>G. intestinalis</i> .
PT	0	0	-	0	0	-
ESC	0	0	-	0	0	-
ENT	0	1	84°C	0	0	-
CB	1	1	85°C	1	0	-
CAP	1	1	84°C	0	0	-
PUC	1	0	-	0	0	-
RAV	0	1	84°C	0	0	-
OCU	0	0	-	0	0	-
HUI	0	1	85°C	0	0	-
SIP	0	0	-	0	0	-

Dónde: 0 = Negativo; 1 = Positivo.

**Tabla N° 18: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Agosto  
2015 para *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.***

AGOSTO						
<i>Cryptosporidium sp.</i>				<i>Giardia sp.</i>		
PUNTOS DE MUESTREO	Sheather – Kinyoun	PCR <i>Cryptosporidium parvum</i>	TM obtenidos para <i>C. parvum</i>	Shether - Lugol Dobell & O'connor	PCR <i>Giardia intestinalis</i>	TM obtenidos para <i>G. intestinalis</i> .
PT	1	1	84°C	0	0	-
ESC	1	0	-	0	0	-
ENT	0	1	85°C	0	0	-
CB	1	1	84°C	0	0	-
CAP	1	1	84°C	0	0	-
PUC	0	1	84°C	0	0	-
RAV	0	0	-	0	0	-
OCU	0	1	85°C	0	0	-
HUI	1	1	84°C	0	0	-
SIP	0	0	-	0	0	-

Dónde: 0 = Negativo; 1 = Positivo.

**Tabla N° 19: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Septiembre 2015 para *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.***

SEPTIEMBRE						
<i>Cryptosporidium sp.</i>				<i>Giardia sp.</i>		
PUNTOS DE MUESTREO	Sheather – Kinyoun	PCR <i>Cryptosporidium parvum</i>	TM obtenidos para <i>C. parvum</i>	Shether - Lugol Dobell & O'connor	PCR <i>Giardia intestinalis</i>	TM obtenidos para <i>G. intestinalis</i> .
PT	1	0	-	0	0	-
ESC	0	0	-	0	0	-
ENT	1	1	84°C	0	0	-
CB	1	1	84°C	0	0	-
CAP	1	1	85°C	1	0	-
PUC	0	0	-	0	0	-
RAV	0	0	-	0	0	-
OCU	0	0	-	0	0	-
HUI	0	0	-	0	0	-
SIP	1	0	-	0	0	-

Dónde: 0 = Negativo; 1 = Positivo.

**Tabla N° 20: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Octubre 2015 para *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.***

OCTUBRE						
<i>Cryptosporidium sp.</i>				<i>Giardia sp.</i>		
PUNTOS DE MUESTREO	Sheather – Kinyoun	PCR <i>Cryptosporidium parvum</i>	TM obtenidos para <i>C. parvum</i>	Shether - Lugol Dobell & O'connor	PCR <i>Giardia intestinalis</i>	TM obtenidos para <i>G. intestinalis</i> .
PT	1	0	-	0	0	-
ESC	0	0	-	0	0	-
ENT	0	0	-	0	0	-
CB	1	1	84°C	0	0	-
CAP	0	0	-	0	0	-
PUC	0	1	83°C	0	0	-
RAV	0	0	-	0	0	-
OCU	0	0	-	0	0	-
HUI	1	1	84°C	0	0	-
SIP	0	0	-	0	0	-

Dónde: 0 = Negativo; 1 = Positivo.

**Tabla N° 21: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo  
Noviembre 2015 para *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.***

NOVIEMBRE						
<i>Cryptosporidium sp.</i>				<i>Giardia sp.</i>		
PUNTOS DE MUESTREO	Sheather – Kinyoun	PCR <i>Cryptosporidium parvum</i>	TM obtenidos para <i>C. parvum</i>	Shether - Lugol Dobell & O'connor	PCR <i>Giardia intestinalis</i>	TM obtenidos para <i>G. intestinalis.</i>
PT	0	0	-	0	0	-
ESC	1	0	-	0	0	-
ENT	0	0	-	0	0	-
CB	1	1	84°C	0	0	-
CAP	0	0	-	0	0	-
PUC	0	0	-	0	0	-
RAV	1	1	83°C	0	0	-
OCU	1	0	-	0	0	-
HUI	0	1	83°C	0	0	-
SIP	1	0	-	0	0	-

Dónde: 0 = Negativo; 1 = Positivo.

**Tabla N° 22: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Diciembre  
2015 para *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.***

DICIEMBRE						
<i>Cryptosporidium sp.</i>				<i>Giardia sp.</i>		
PUNTOS DE MUESTREO	Sheather – Kinyoun	PCR <i>Cryptosporidium parvum</i>	TM obtenidos para <i>C. parvum</i>	Shether - Lugol Dobell & O'connor	PCR <i>Giardia intestinalis</i>	TM obtenidos para <i>G. intestinalis.</i>
PT	0	0	-	0	0	-
ESC	1	0	-	0	0	-
ENT	0	1	84°C	0	0	-
CB	1	1	84°C	0	0	-
CAP	1	1	84°C	0	0	-
PUC	0	0	-	0	0	-
RAV	0	0	-	0	0	-
OCU	1	1	85°C	0	0	-
HUI	1	1	84°C	0	0	-
SIP	0	0	-	0	0	-

Dónde: 0 = Negativo; 1 = Positivo.

**Tabla N° 23: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Enero 2016 para *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.***

ENERO						
<i>Cryptosporidium sp.</i>				<i>Giardia sp.</i>		
PUNTOS DE MUESTREO	Sheather – Kinyoun	PCR <i>Cryptosporidium parvum</i>	TM obtenidos para <i>C. parvum</i>	Shether - Lugol Dobell & O'connor	PCR <i>Giardia intestinalis</i>	TM obtenidos para <i>G. intestinalis.</i>
PT	0	1	85°C	0	0	-
ESC	1	1	84°C	0	0	-
ENT	1	1	84°C	0	0	-
CB	1	1	84°C	0	0	-
CAP	1	1	84°C	0	0	-
PUC	0	0	-	0	0	-
RAV	0	1	84°C	0	0	-
OCU	0	1	85°C	0	0	-
HUI	0	1	85°C	0	0	-
SIP	1	1	84°C	0	0	-

Dónde: 0 = Negativo; 1 = Positivo.

**Tabla N° 24: Resultados obtenidos durante el mes de muestreo Febrero 2016 para *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.***

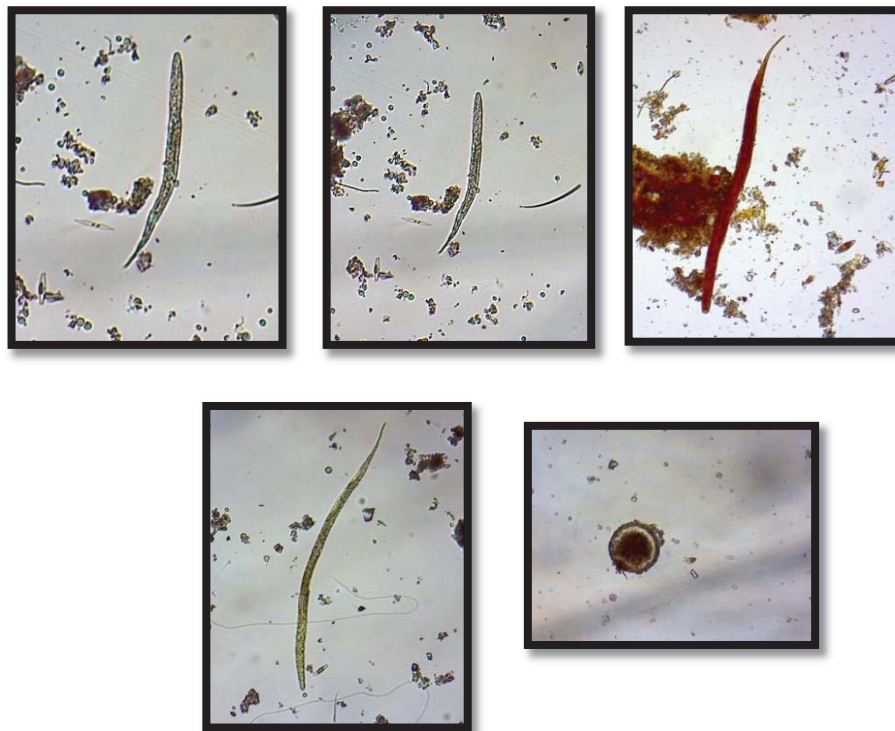
FEBRERO						
<i>Cryptosporidium sp.</i>				<i>Giardia sp.</i>		
PUNTOS DE MUESTREO	Sheather – Kinyoun	PCR <i>Cryptosporidium parvum</i>	TM obtenidos para <i>C. parvum</i>	Shether - Lugol Dobell & O'connor	PCR <i>Giardia intestinalis</i>	TM obtenidos para <i>G. intestinalis.</i>
PT	0	1	84°C	0	0	-
ESC	1	1	83°C	0	0	-
ENT	1	1	84°C	0	0	-
CB	1	1	84°C	0	0	-
CAP	1	1	84°C	0	0	-
PUC	1	1	84°C	0	1	87°C
RAV	1	1	83°C	0	0	-
OCU	1	1	85°C	1	1	87°C
HUI	1	1	84°C	0	0	-
SIP	1	1	85°C	0	0	-

Dónde: 0 = Negativo; 1 = Positivo.



**Tabla N° 25: Resultados por pruebas de certeza parasitológica Formol – éter, durante los meses Julio 2015 a Febrero 2016.**

PUNTOS DE MUESTREO	Formol – Eter
PT	huevos de <i>Ascaris</i> (Oct), larvas de <i>Strongylos</i> (Feb)
ESC	larvas de <i>Strongylos</i> (Nov), larva de <i>Uncinarias</i> (Ene), larva de <i>Nemátodo</i> (Feb)
ENT	Larva de <i>Nemátodo</i> (Dic)
CB	Larvas de <i>Nemátodos</i> (Feb), larvas de <i>Strongylos</i> (Feb)
CAP	huevos de <i>Ascaris</i> (Ago), larvas de <i>Nemátodo</i> de vida libre, larvas de <i>Uncinaria</i> (Feb)
PUC	huevos de <i>Ascaris</i> (Ago), <i>Entamoeba coli</i> (Nov), huevo de <i>Enterobius</i> (Ene)
RAV	larvas de <i>Strongylos</i> (Ago), huevos de <i>Uncinaria</i> (Sep), larva de <i>Nemátodo</i> de vida libre (Ene).
OCU	<i>Amebas de Vida Libre</i> (Nov)
HUI	Larva de <i>Nematodo</i> , huevos de <i>Uncinaria</i> (Nov)
SIP	Negativo.



**Figura N° 33-37: Larvas de *Strongylos* (33, 34, 35), Huevos de *Nemátodo* (36) y *Nemátodo* de vida libre (37) encontrados mediante la técnica de Formol – éter en el cuerpo léntico de Piuray, durante los meses Julio 2015 a Febrero 2016, observados al microscopio a 40X, con una amplificación de cámara a 10X.**

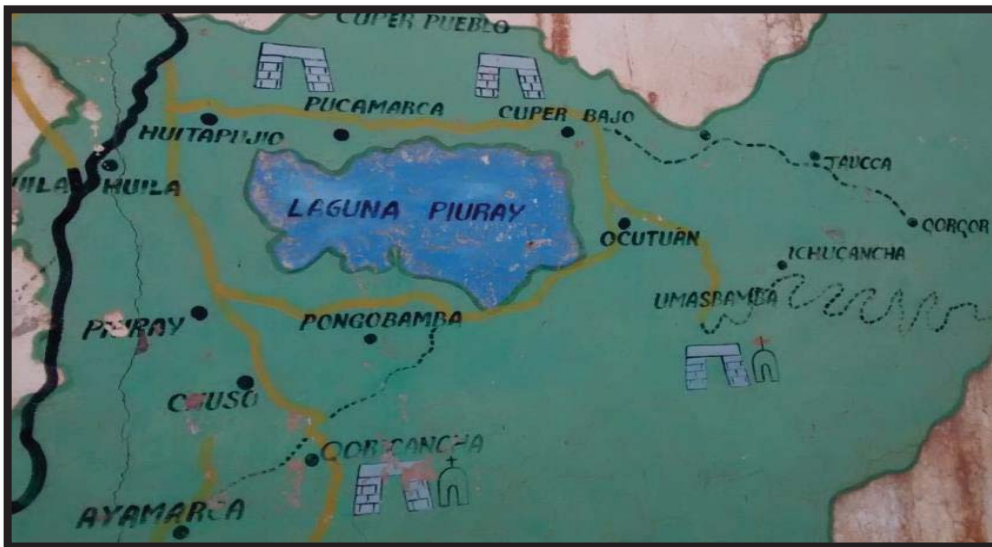


Figura N° 38: Mapa del cuerpo léntico de Piuray, tomado del letrero de la zona de Alapchaca, dónde se observa los diferentes centros poblados alrededor del cuerpo de agua.



Figura N° 39: Fotografía del GPS map 76s (GARMIN), utilizado para la presente investigación.

**TOMA DE MUESTRAS:**



**Figura N° 40: Toma de muestra en el cuerpo léntico de Piuray**



**Figura N° 41: Punto Sipicunapampa, se usaron guantes de látex como medida de bioseguridad y baldes de polipropileno enjuagados, limpios y con previo enjuague con agua del**



**Figura N° 42: Toma de muestra en el cuerpo léntico de Piuray; en el punto de Sipicunapampa.**



**Figura N° 43: Ganado pastando a la orilla del cuerpo léntico de Piuray, en el punto de muestreo de Cúper Bajo.**

de



**Figura N° 44: Toma de muestra en el cuerpo léntico de Piuray, en el punto Cuper Bajo.**



**Figura N° 45: Toma de muestra en el punto Ocutuan**



**Figura N° 46: Se observa contaminación en el punto Escuela**



**Figura N° 47: Toma de muestra en el punto Escuela**



**Figura N° 49: Contaminación en PT**



**Figura N° 48: Toma de muestra en punto ENT**



**Figura N° 50: Se observa contaminación en el punto Escuela**



**Figura N° 51: Toma de muestra punto Caparay**



**Figura N° 52: Contaminación con residuos sólidos en Caparay**





**Figura N° 53: Punto Entrada “Captación del Sistema Piuray”**



**Figura N° 54: Punto Entrada con presencia de ganado pecuario y utilizado como área de cultivo**



**Figura N° 55: Punto Entrada se observó un tractor para realizar cultivo**



**Figura N° 56: Toma de muestra del punto Entrada**



**Figura N° 58: Toma de muestra punto Huilla – Huilla (tributario)**



**Figura N° 60: Punto Huilla – Huilla  
contaminación fecal de animales**



**Figura N° 59: Punto Huilla – Huilla  
contaminación del agua**



**Figura N° 61: Traslado de los baldes a la ciudad del Cusco, para ser procesados en los laboratorios de Parasitología en la Escuela Profesional de Biología**



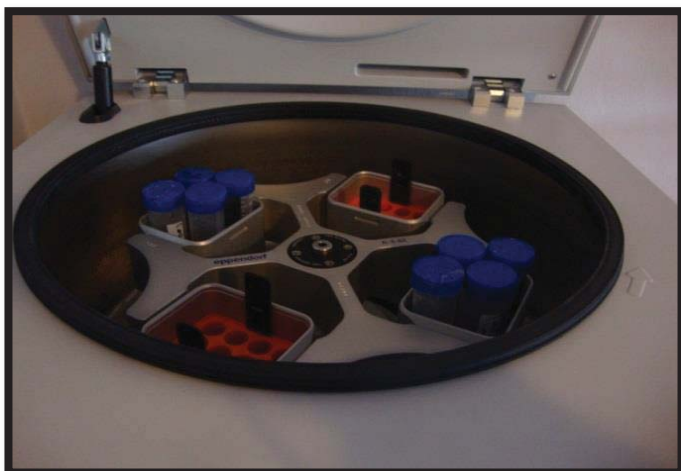
**Figura N° 62: Sedimentación por gravedad simple durante 24 horas, para obtener sedimento y posteriormente, descartar aproximadamente 12 L de sobrenadante.**



**Figura N° 63: Concentración del sedimento 8L**



**Figura N° 64: 8 envases de 1 litro**



**Figura N° 65: Centrifugación en tubos de 50mL, en la centrifugadora Centrifuga Modelo AG Centrifuge 5810 (EPPENDORF), a 2300 RPM durante 5 minutos.**





Figura N° 66: Tubos de 50 ml para obtener el sedimento



Figura N° 67: Obtención los frascos de sedimento obtenido por cada punto de muestreo y almacenados de acuerdo al procedimiento que se utilizó.

## TECNICAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA:

### TÉCNICA SHEATHER:

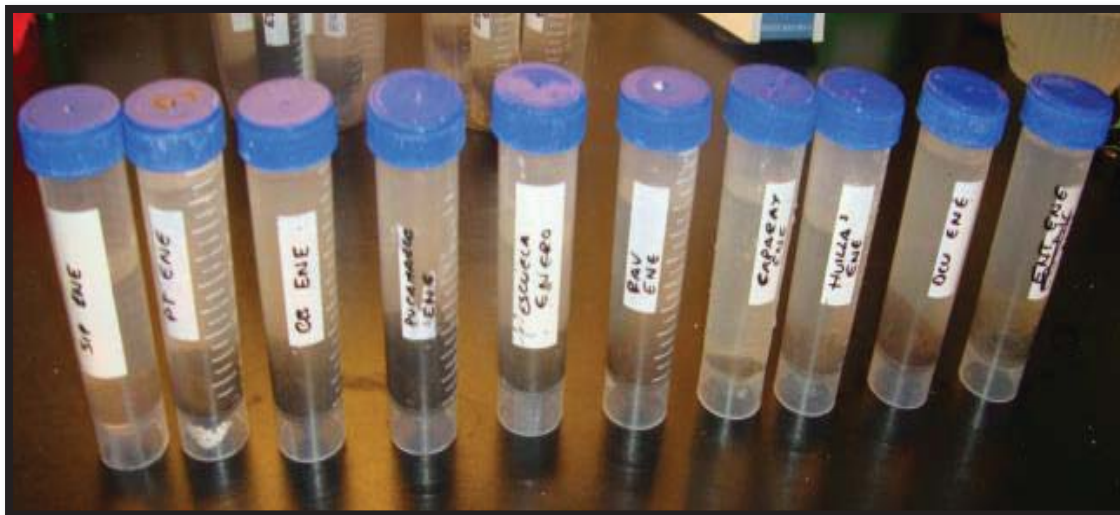


Figura N° 68: Muestras seleccionadas, dónde se descartó el sobrenadante y se mantuvo 20 ml del sedimento

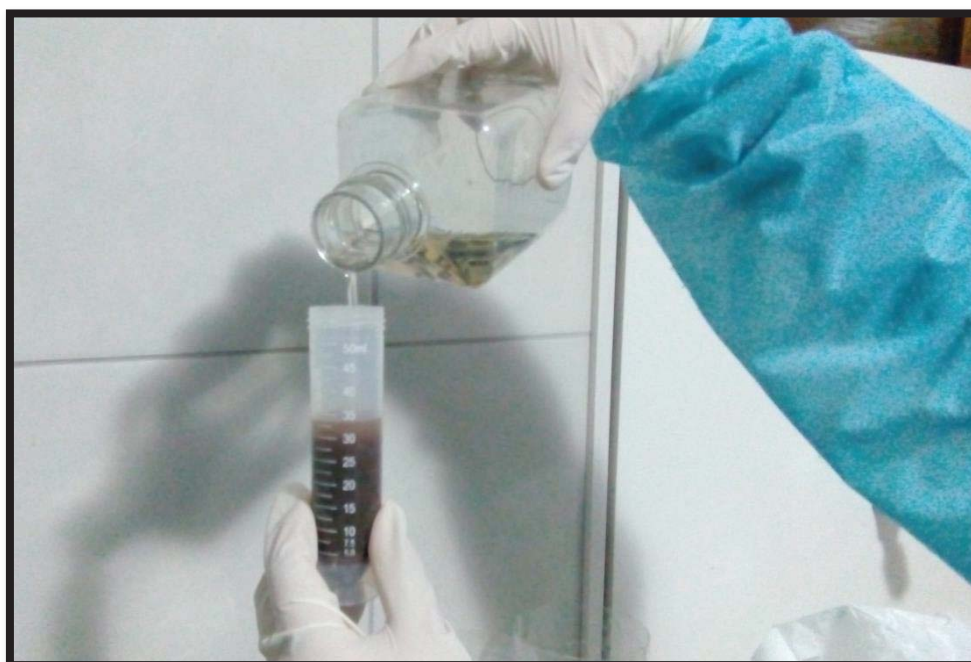


Figura N° 69: Se Agregó solución Sheather- sugar saturada y se mezcló con la ayuda de un vortéx para homogenizar bien las muestras.

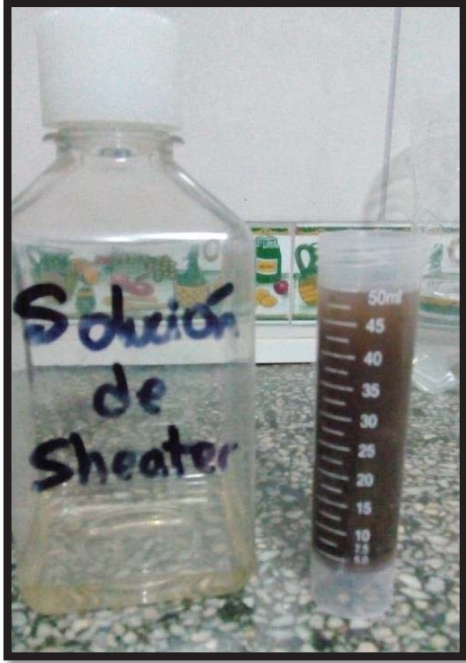


Figura N° 71 : Solución Sheater basado em el Manual INS 2003



Figura N° 70: procedimientos para la técnica de Flotación Sheater

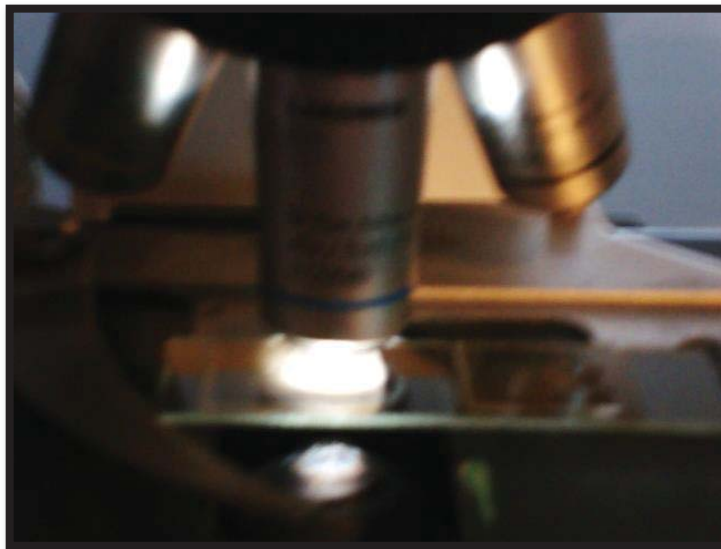


Figura N° 72: Se observó la superficie del sobrenadante con una gota de lugol parasitológico a microscopio, a 4X, 10X y 40X.



## COLORACIÓN KINYOUN



Figura N° 73: Extendido de las muestras, fijadas con metanol.



Figura N° 75: Bateria de coloración Kinyoun



Figura N° 74: Coloración de las láminas con Fucsina fenicada durante 30 minutos.



Figura N° 76: Decoloración con alcohol acido durante 1 minuto.



Figura N° 77: Coloración con el colorante de contraste: azul de metileno durante 1 minuto.

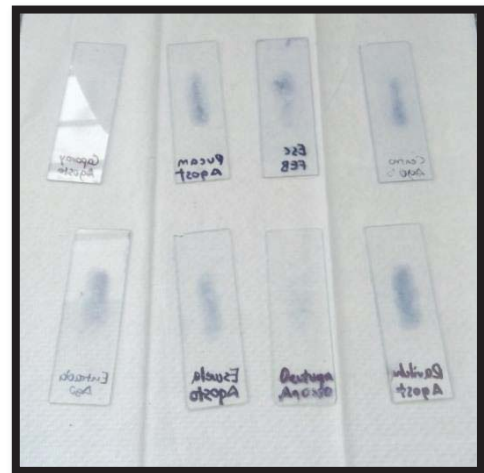
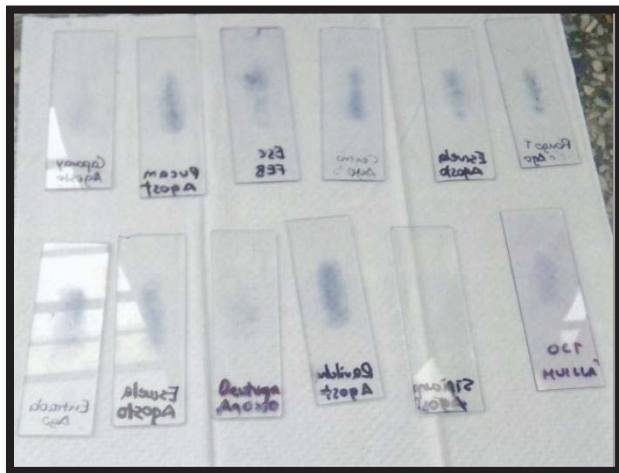


Figura N° 78: Láminas secadas a temperatura ambiente, para su posterior observación a 100X en el microscopio.

### TÉCNICA DE FORMOL – ÉTER

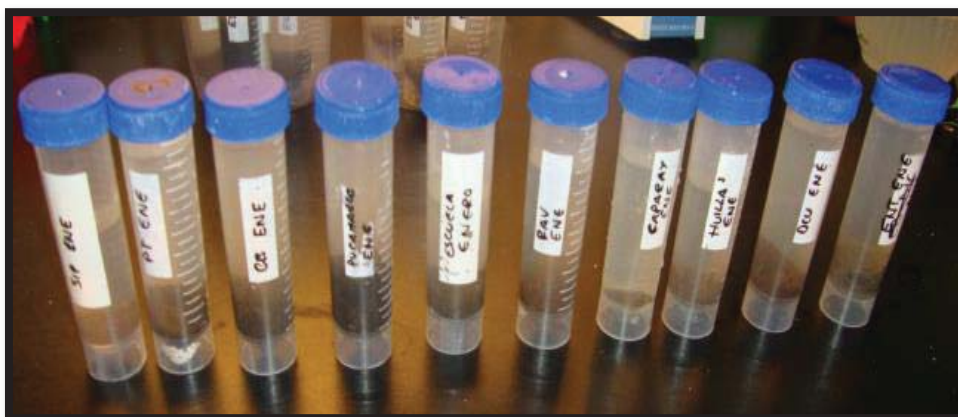


Figura N° 79: Muestras seleccionadas para prueba de certeza parasitológica: formol – éter. Dónde se Descartó el sobrenadante y se mantuvor 30ml del sobrenadante y se agregó 10 ml de formol al 10%.



Figura N° 80: Formol al 10%



Figura N° 82: Se agregó 5 ml de Eter



Figura N° 81: se agitó efusivamente durante 20 segundos.

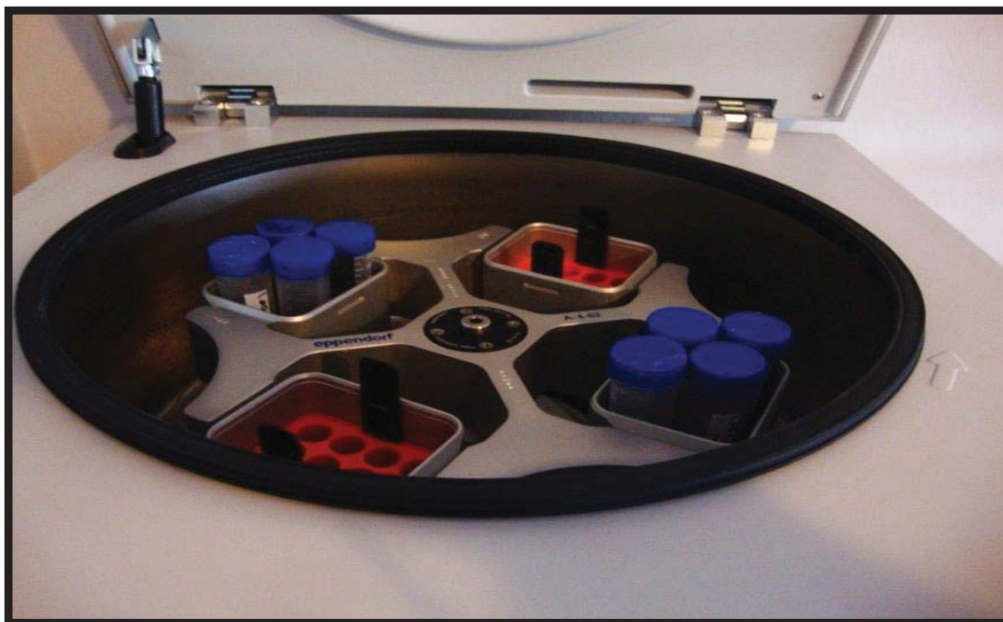
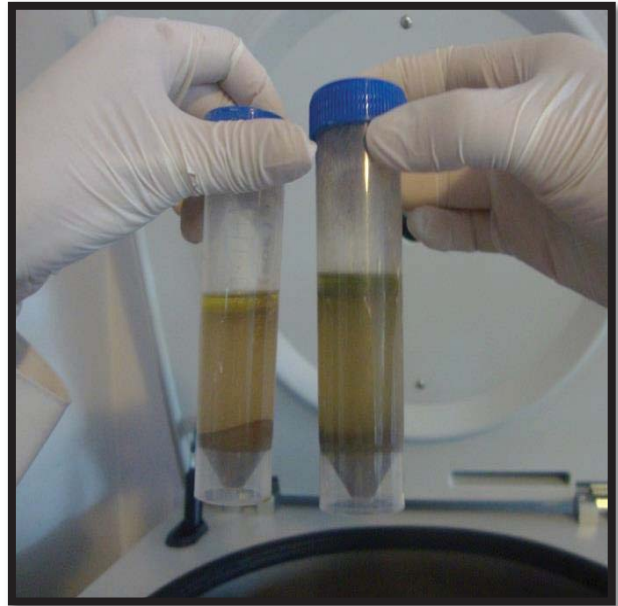


Figura N° 83: Centrifugar a 2300 rpm por 2 min.



**Figura N° 84:** Dos capas, se descarta el sobrenadante.



**Figura N° 85:** El sedimento. Posteriormente, el sedimento fue leído en placa a 4X y 10X en el microscopio.

## EXTRACCION DE ADN

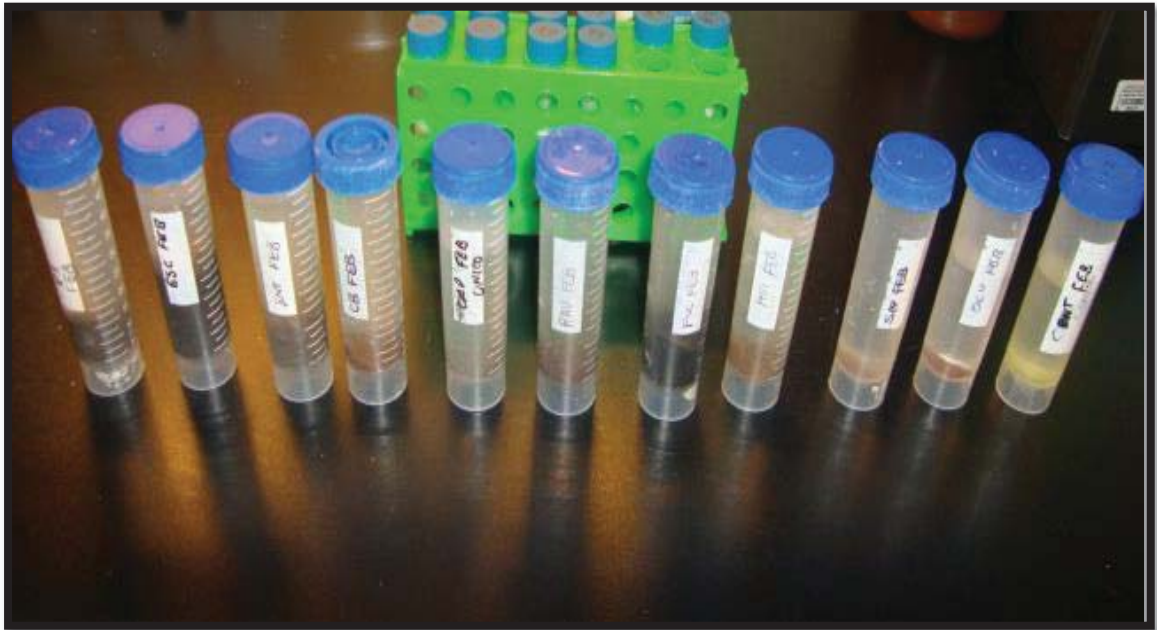


Figura N° 86: Muestras seleccionadas de cada punto para la extracción de ADN.

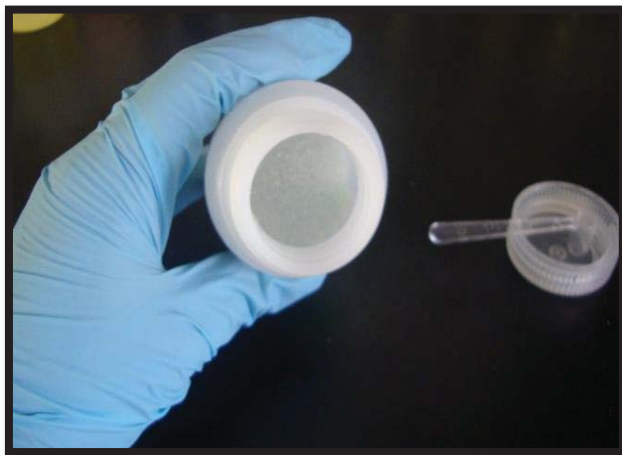


Figura N° 87: Pesar 500 mg de perlas de vidrio (beats).



**Figura N° 88: Desinfección la cámara de bioseguridad con lejía al 5 % para iniciar el procedimiento de extracción.**



**Figura N° 89: Protocolo de extracción Mag Bind Soil DNA kit.**



Figura N° 91: vortex, para que los beats rompan las estructuras y liberen el ADN

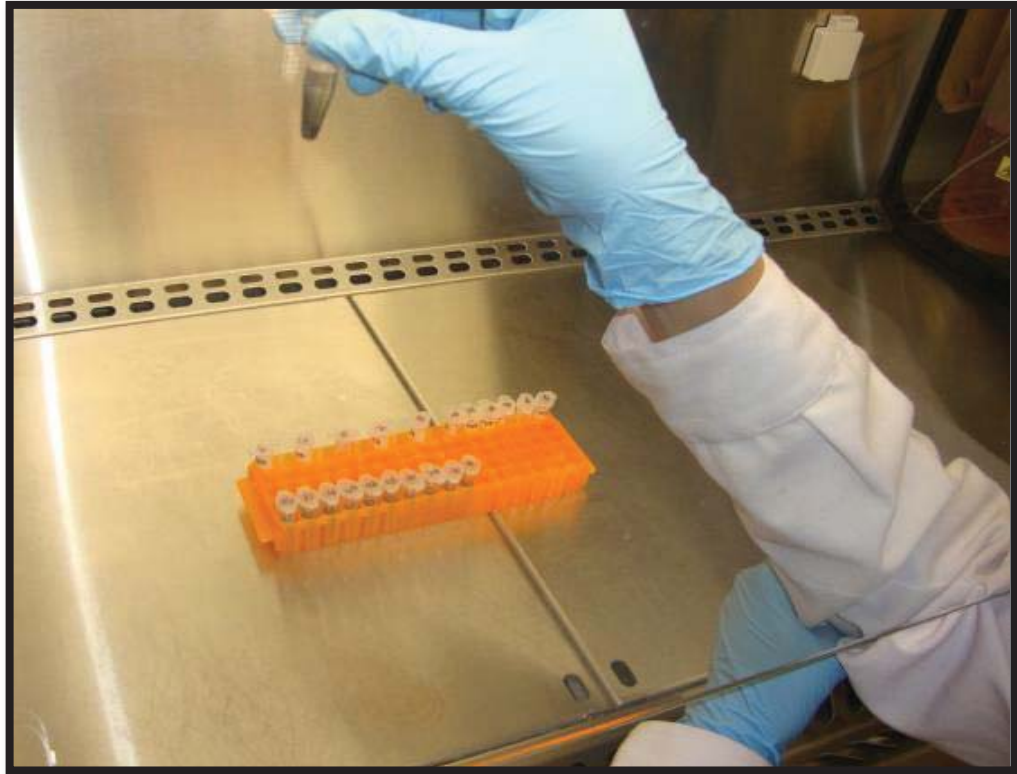


Figura N° 90: Inhibidores de las DNAsas

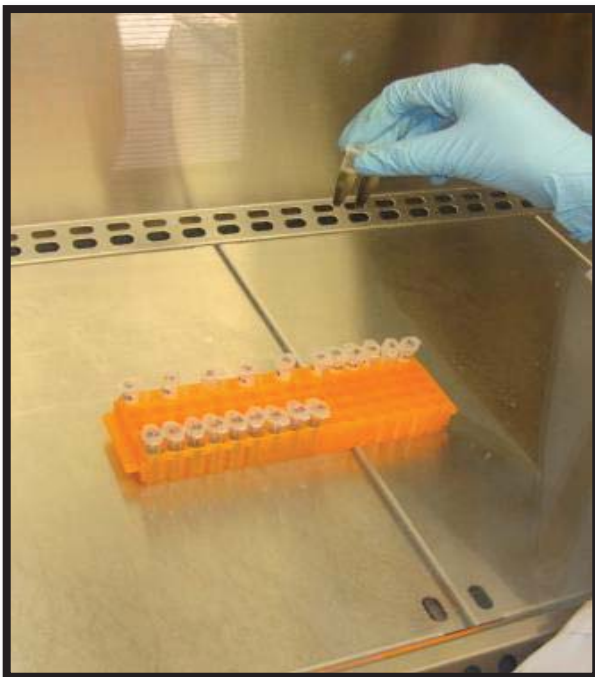


Figura N° 92: Shock térmico





**Figura N° 93: Sobrenadante trasvasado a microtubos de 2mL libre de ADNAsas**



**Figura N° 94: Muestras debidamente rotulados**



**Figura N° 95: Ultracentrifuga**

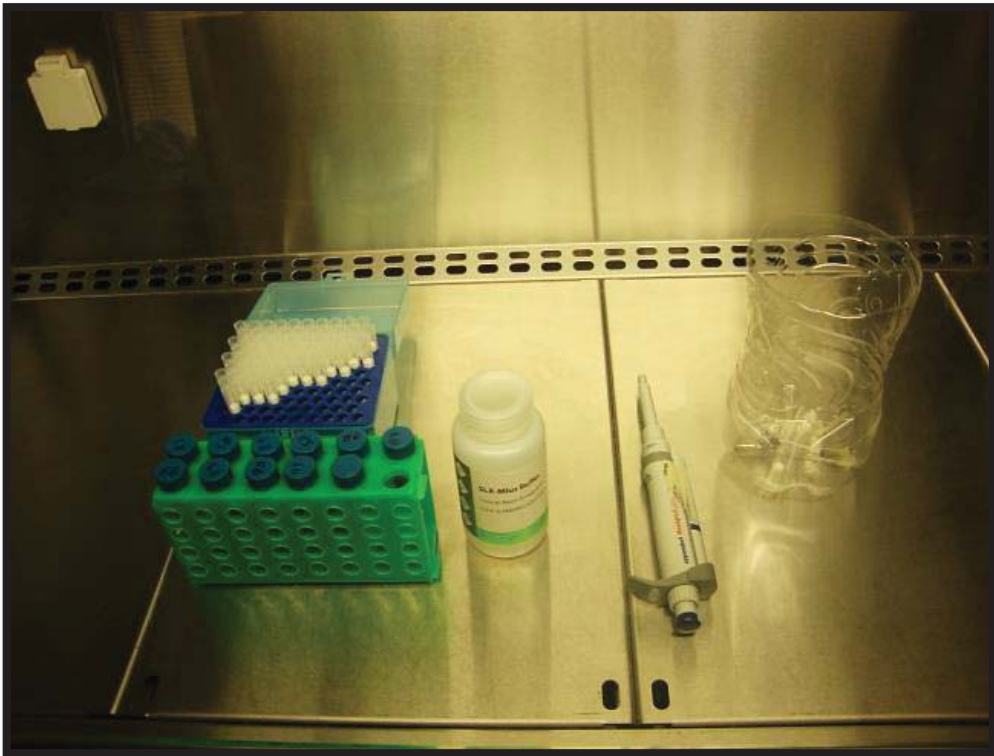


Figura N° 96: Se continuó con el protocolo de extracción Mag Bind DNA Soil Kit, agregando los reactivos en orden establecido.

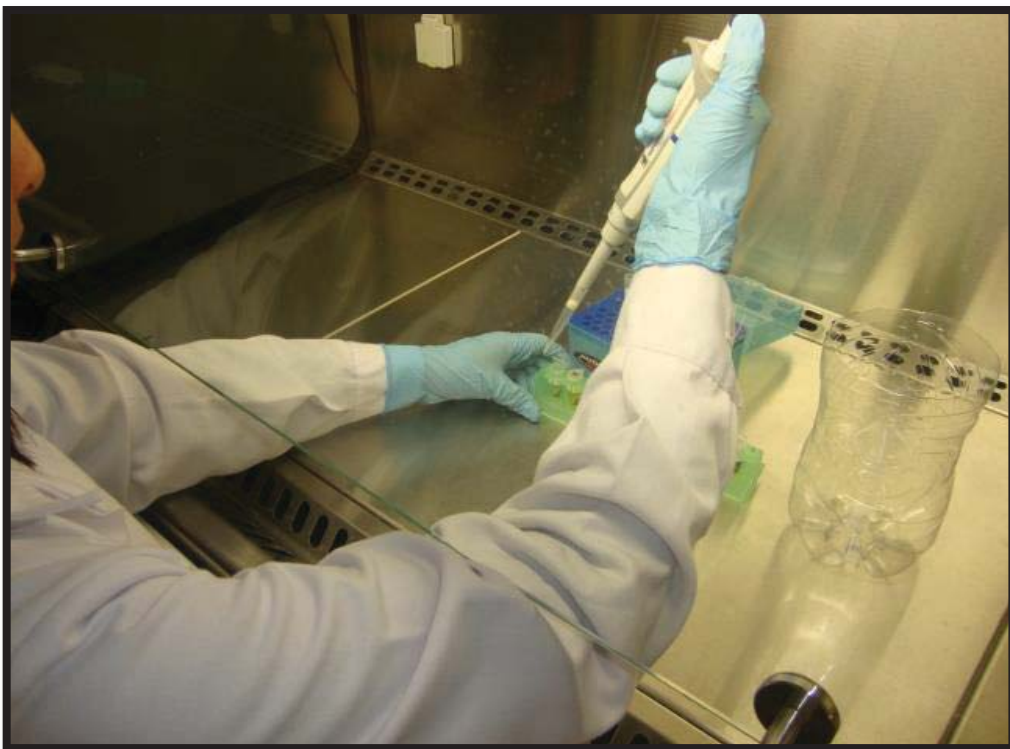
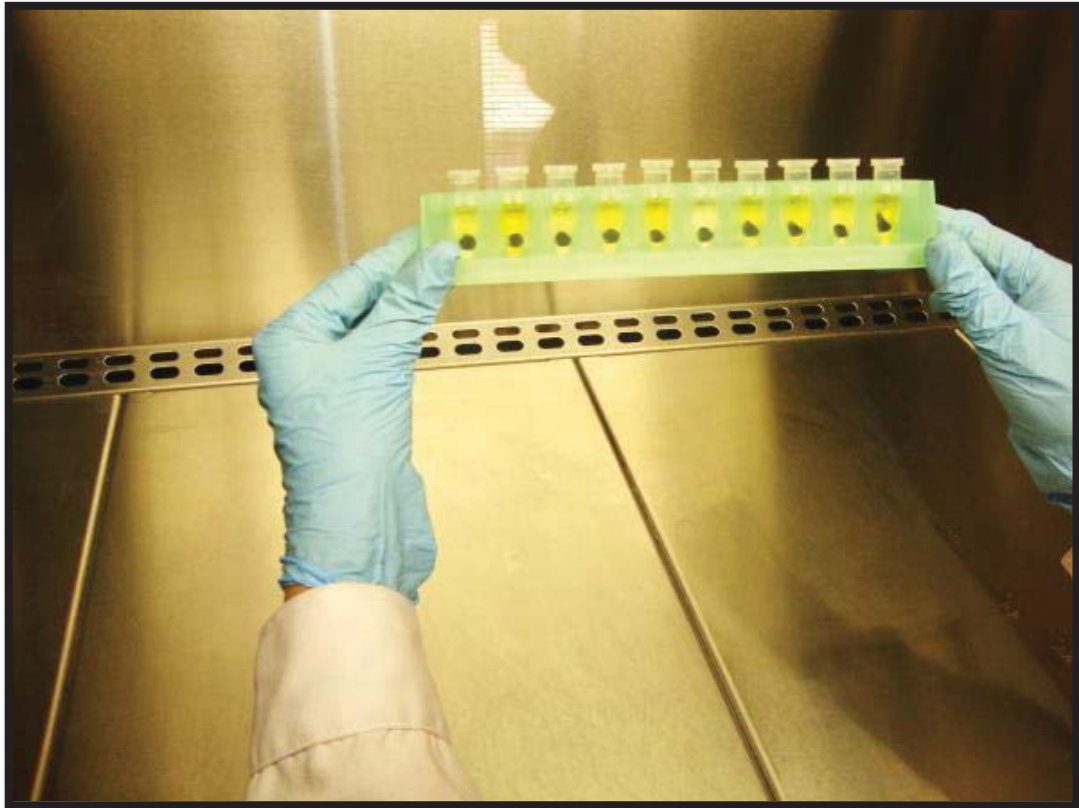
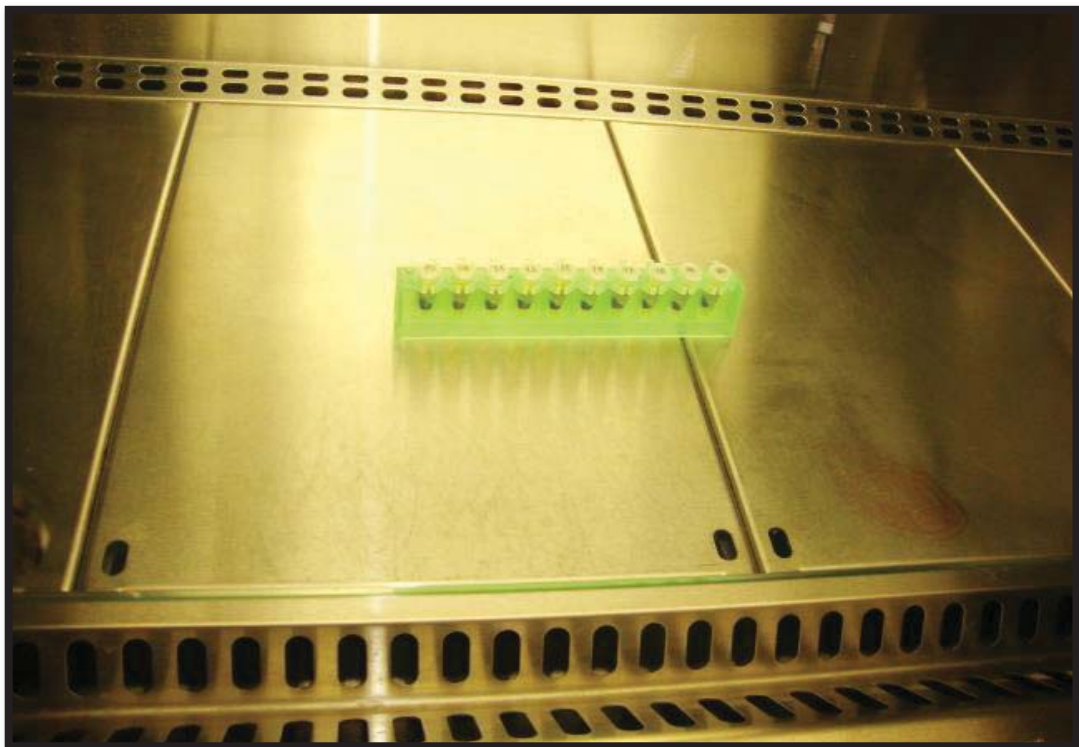


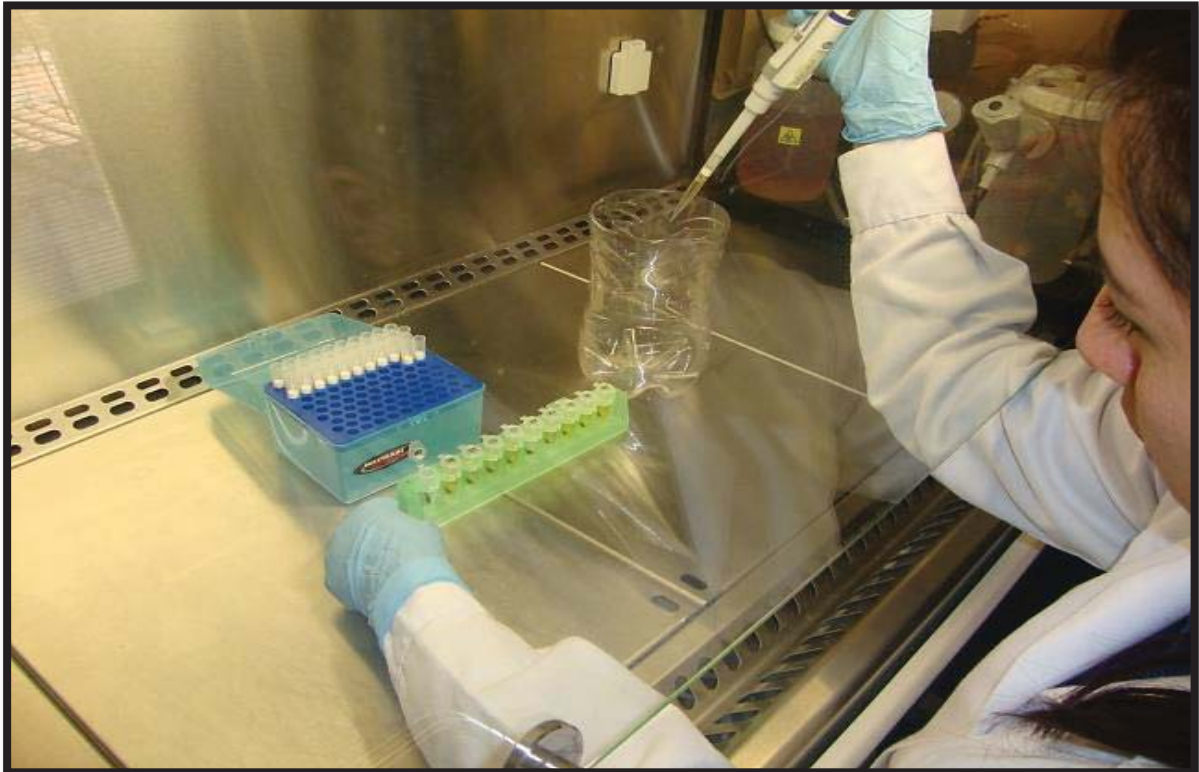
Figura N° 97: los buffers respectivos para el proceso de lavado fueron agregados



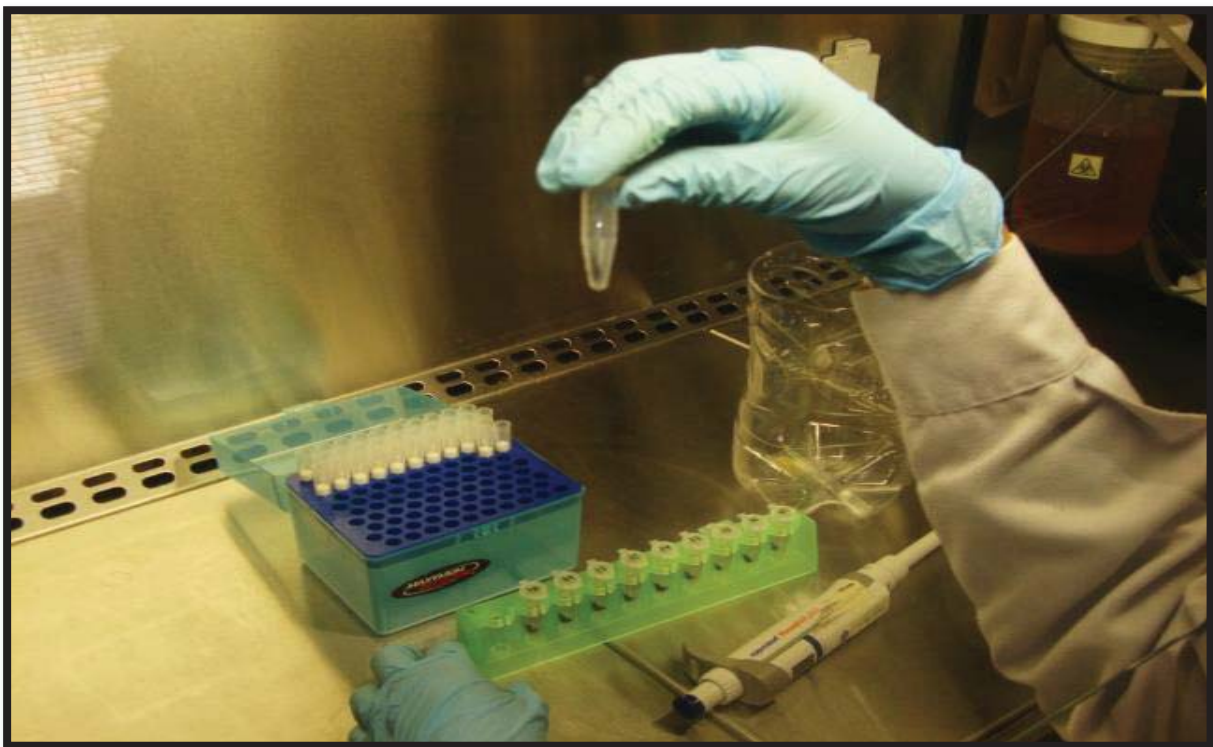
**Figura N° 99: Se observa la adhesión de las partículas de CND a la placa magnética**



**Figura N° 98: El ADN se adhiere a las partículas CND**



**Figura N° 100: Descartar el sobrenadante sin mover las particular de CND adheridas**



**Figura N° 101: Se observa las partículas CND que contienen ADN**

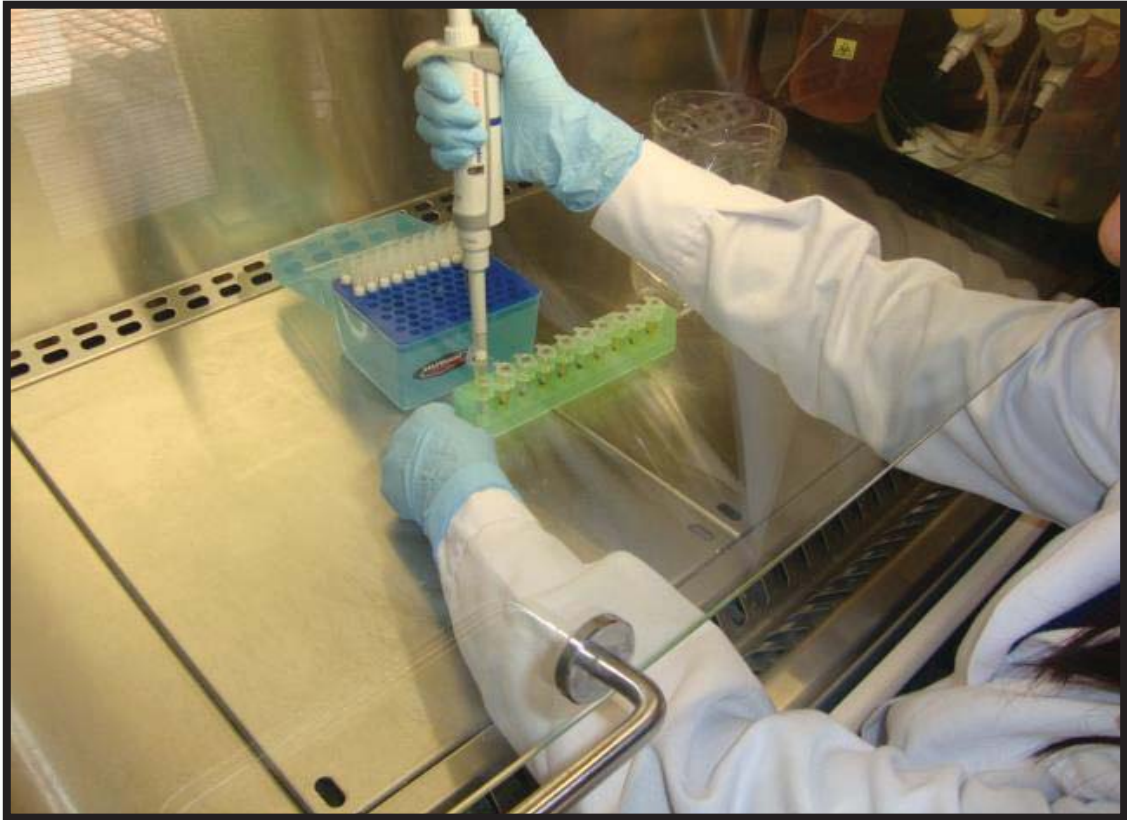


Figura N° 103: Se continuó con el protocolo de extracción, agregando y retirando las soluciones de lavado

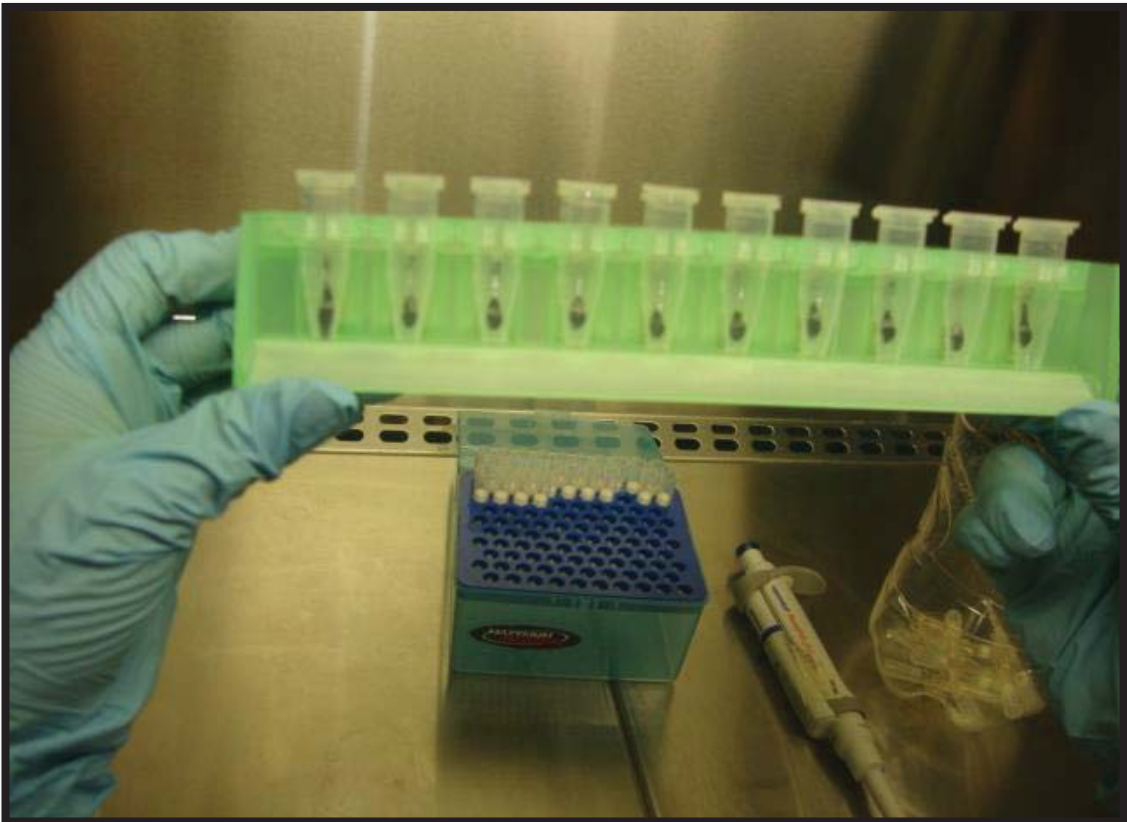
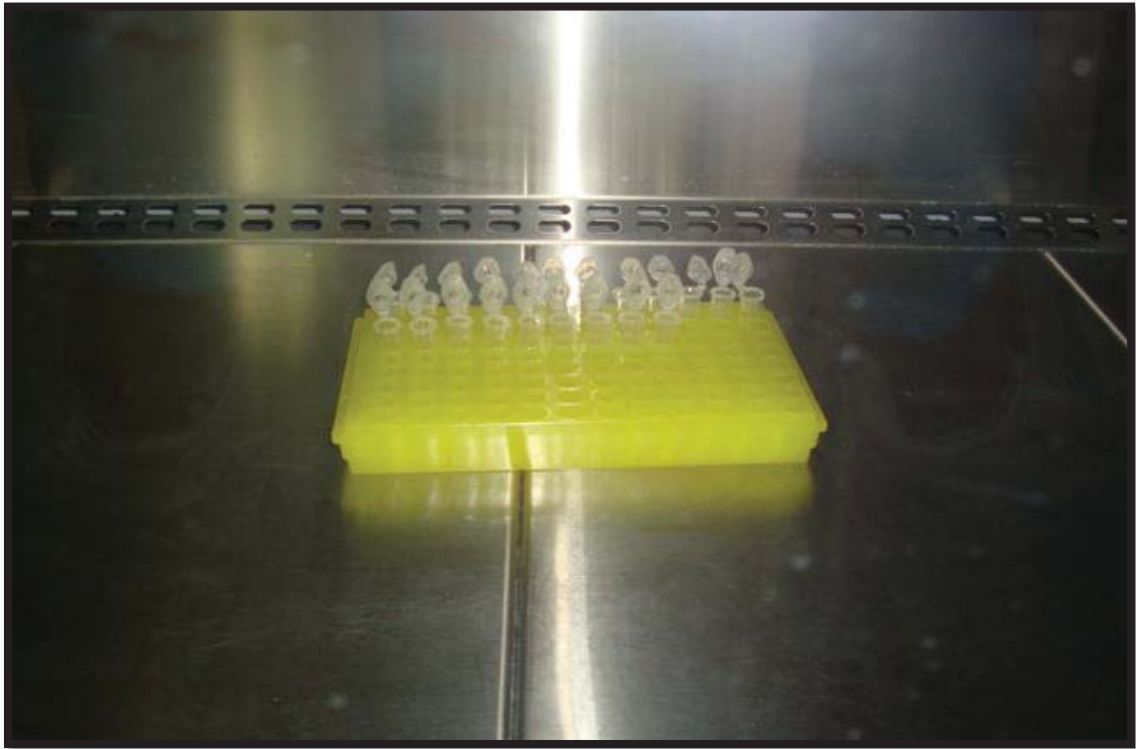


Figura N° 102: Retiramos el sobrenadante, para obtener las partículas CND pegados a la placa



**Figura N° 104: Secar las partículas de CND durante una a dos horas, para que el etanol sobrenadante se evapore.**



**Figura N° 105: Agregar el buffer elution e incubar a temperatura ambiente**



Figura N° 106: La elucion obtenida se lee por espectrofotometría Nanodrop 2000

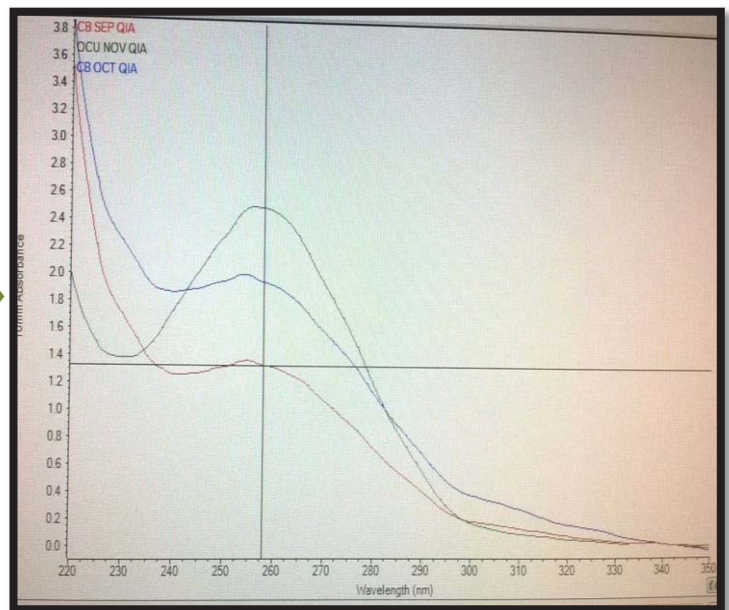
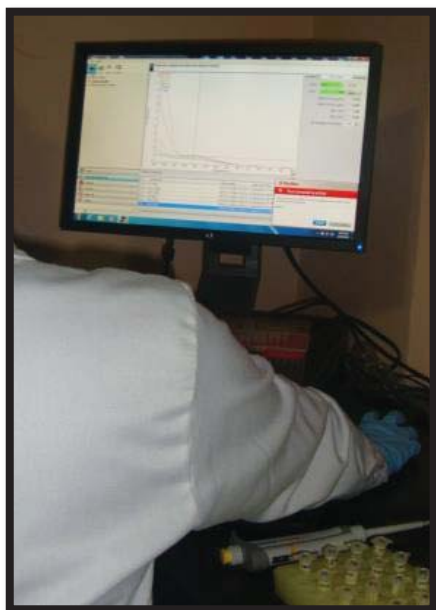


Figura N° 107: rotular la concentracion y pureza.

## PCR EN TIEMPO REAL:

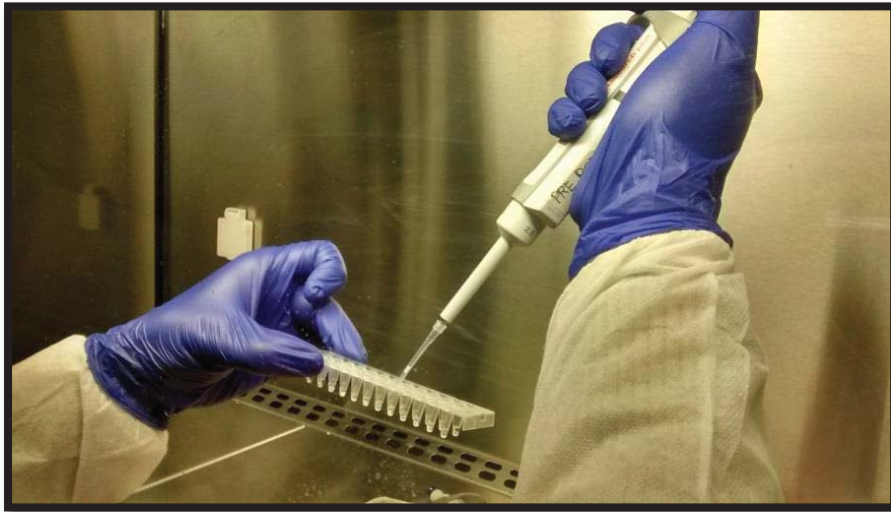


Figura N° 108: Muestras de ADN de cada punto de muestreo, primer y Sso Advance, conservados a  $-4^{\circ}\text{C}$ , se descongelaron y se realizó un vortex y un spin down para la corrida de PCR.



Figura N° 109:  
Master Mix



Figura N° 111: Sso  
Advance Universal SYBR  
Green Super Mix

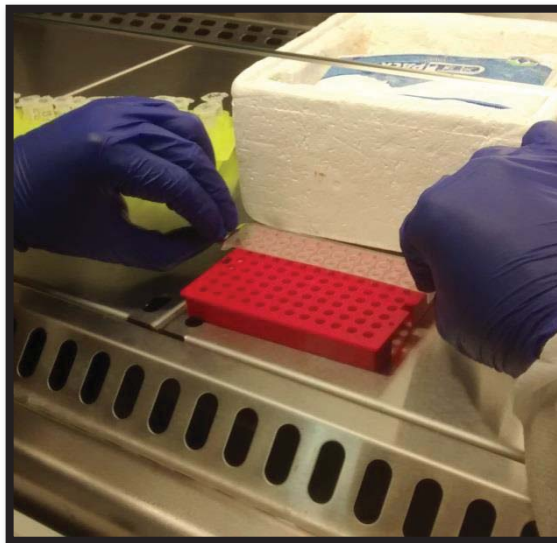


Figura N° 110: Agua libre  
de Nucleasas





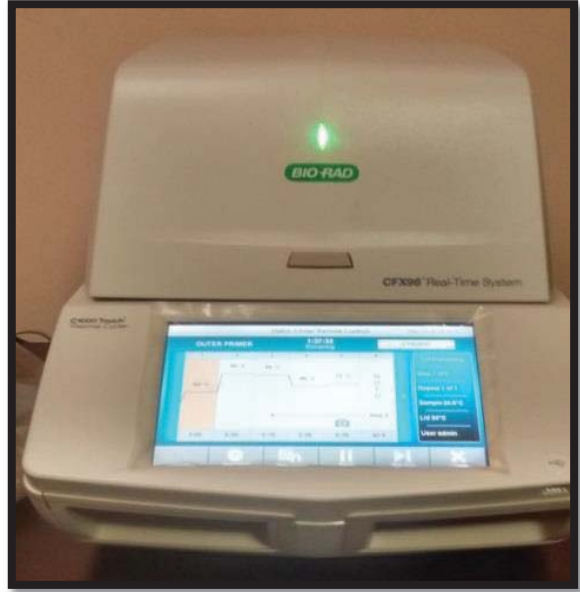
**Figura N° 112: Se distribuyó 18 $\mu$ L de Master Mix en los pozos de corrida del PCR**



**Figura N° 113: Sellar los pozos con el syler, para evitar evaporación de muestras en el termociclador.**



**Figura N° 115: colocaron los pozos en el Termociclador**



**Figura N° 114: Termociclador programado con los protocolos**

**C4.4 Solución de Sheather Sugar**

Sacarosa o azúcar blanca .....	500,00 g
Agua destilada .....	320,00 mL
Fomol (o fenol) .....	10,00 mL (6,00 mL)

**C4.5 Solución saturada de azúcar**

Sacarosa (azúcar rubia) .....	500,00 g
Agua destilada .....	500,00 mL
Fomol 40% .....	10,00 mL

**C4.6 Solución mordiente**

Sulfato de fierro y amonio .....	4,00 g
Agua destilada .....	100,00 mL

**C4.7 Solución de salicilato de metilo**

**C4.8 Solución de alcohol-ácido 3%**

Ácido clorhídrico concentrado .....	3,00 mL
Etanol al 95% .....	97,00 mL

**C4.9 Solución de hidróxido de sodio**

Hidróxido de sodio .....	4,00 g
Agua destilada .....	100,00 mL

**C4.10 Tintura de yodo (solución madre)**

Yodo .....	5,00 g
Yoduro de potasio .....	3,00 g ó 7,00 mL
Alcohol 95% .....	20,00 mL
Agua destilada .....	7,00 mL

Diluir el yoduro de potasio en 10mL de alcohol, añadiendo agua a los cristales restantes.



RESULTADOS PROMEDIO MENSUALES DE ANALISIS DEL PUNTO DE CAPTACION - LAGUNA PIURAY

PARAMETRO ANALIZADO	AÑO 2015												AÑO 2016		
	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO			
FOSFORO TOTAL	0.04	0.005	0.05	0.085	0.025	0.08	0.085	0.03	0.1	0.03	0.055	2.565			
ALCALINIDAD	70.92	90.34	76.81	78.115	71.735	66.835	63.515	58.425	64.06	59.615	57.505	66.57			
DUREZA TOTAL	164.54	173.57	177.19	184.105	179.555	164.37	149.52	182.545	180.16	186.635	142.695	166.34			
CALCIO	57.39	58.595	57.81	60.2	63.045	60.205	55.45	62.245	63.355	68.91	47.205	62.18			
MAGNESIO	5.12	6.585	7.94	8.17	5.33	3.37	2.645	6.545	5.29	3.49	6.015	2.645			
CLORUROS	9.645	10.415	9.42	9.23	10.02	9.575	10.385	10.485	9.66	9.83	7.645	9.83			
TURBIEDAD	7.14	10.635	7.475	7.44	10.21	8.695	11.2	6.41	5.77	2.425	4.48	5.04			
COLOR	10	20.5	30	27.5	30	27.5	35	25	25	17.5	25	18			
SOLID.DIS.TOTAL	260	272	283	279.5	276	271	257	253.5	255	256.5	239	241.5			
CONDUCTIVIDAD	371.5	388.5	401	399.5	394.5	378	363.5	293	289	302.5	325.5	331.5			
SALINIDAD	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1			
TEMPERATURA	15.4	15.8	14.05	14.05	14.45	14.3	18.3	16.2	16.45	14.15	17.25	18.45			
NITRATOS	0.12	0.01	0.02	0.02	0.05	0.07	0.05	0.05	0.05	0.105	0.09	0.06			
SULFATOS	93.375	112.775	104.485	106.015	120.565	114.565	98.99	107.035	99.76	84.32	95.55	62.745			
pH	8.43	8.38	7.66	8.475	9.15	8.95	9.305	8.125	8.905	8.55	8.69	8.455			
DBO5	4.0	4.3	5.8	7.6	3.3	6.4	7.7	5.5	6.4	7.3	6.1	4.9			
OXIG. DISUELT.	3.9	3.3	0.0	5.5	7.0	7.7	6.8	5.2	6.0	6.7	6.1	5.4			





UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt

DIRECTOR  
Dr. Eduardo Gotuzzo H.

DIRECTOR ADJUNTO  
Dr. Carlos Seas R.

COMITÉ DIRECTIVO  
Dr. Jorge Arévalo Z.  
Dr. Alejandro Llanos C.  
Dra. Frine Samalvides C.  
Dr. Carlos Seas R.  
Dr. Manuel del Solar Ch.

## CONSTANCIA

El Instituto de Medicina Tropical Sede Cusco de la Universidad Peruana Cayetano Heredia deja constancia que:

### FRECIA MARIBEL MAMANI LICONA Y MARTHA VANESSA FERNANDEZ BACA CAMPOS

tesistas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, recibieron asesoría y realizaron el estudio:

#### "EVALUACION DE *Cryptosporidium sp* Y *Giardia sp* EN EL CUERPO LENTICO DE PIURAY POR PRUEBAS DE CERTEZA PARASITOLÓGICA Y PCR EN TIEMPO REAL"

Todos los procedimientos se realizaron en los laboratorios de biología molecular y microbiología de nuestra institución.

Se expide el presente documento a petición de las interesadas, para los fines que vean convenientes.



Miguel M. Cabada, MD MSc  
Director  
Instituto de Medicina Tropical Sede Cusco  
Universidad Peruana Cayetano Heredia

UNIVERSIDAD ACREDITADA INTERNACIONALMENTE CON MENCIÓN ESPECIAL EN INVESTIGACIÓN

**50** AÑOS DE  
EXCELENCIA ACADÉMICA Y  
A LA VANGUARDIA DE  
LA INVESTIGACIÓN

Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, P.O Box 4314, Lima 100  
Teléfonos: (511) 613-9797 / 482-3903 / 482-3910 Fax: (511) 482-3404  
Página Web: [www.upch.edu.pe/tropicales/](http://www.upch.edu.pe/tropicales/)

.....  
Blga. Emperatriz Madera Tupayachi.

Primera Dictaminante.

.....  
Mgt. Griselda Muñiz Durán.

Segunda Dictaminante.

.....  
Dra. Heldy Yiyi Espinoza Carrasco

Primera Replicante

.....  
Dra. María Antonieta Quispe Ricalde

Segunda Replicante