



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

Tesis para la obtención del título de

**BIÓLOGA**

**IDENTIFICACIÓN DEL PARÁSITO *Cryptosporidium* sp.**

**EN CARACOLES *Lissachatina fulica* EN LAS  
PROVINCIAS DEL GUAYAS Y LOS RÍOS, ECUADOR**

**BIUTTY MARGARITA CAZORLA CAICEDO**

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**2014**

**© Derechos de autor**  
Biutty Margarita Cazorla Caicedo  
2014

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio del Subproceso de Parasitología del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” (INHMT“LIP”), actualmente llamado Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), inicialmente bajo la supervisión del Dr. Luiggi Martini Robles, y actualmente por el Dr. Luis Solórzano Álava, quien fue designado por la Facultad de Ciencias Naturales como Co-Director y por el Dr. Francisco Ratti Chinga, MSc. Profesor Académico y Director de la Tesis.

### **Director de Tesis**

---

***Dr. Francisco Ratti Chinga, MSc.***

### **Co – Director de Tesis**

---

***Dr. Luis Solórzano Álava.***

**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

CALIFICACIÓN QUE OTORGA EL TRIBUNAL QUE RECIBE LA  
SUSTENTACIÓN Y DEFENSA DEL TRIBUNAL INDIVIDUAL DE TITULACIÓN

**TESIS**

**IDENTIFICACIÓN DEL PARÁSITO *Cryptosporidium* sp.  
EN CARACOLES *Lissachatina fulica* EN LAS  
PROVINCIAS DEL GUAYAS Y LOS RÍOS, ECUADOR**

**BIUTTY MARGARITA CAZORLA CAICEDO**

Previo a obtener el título de **BIÓLOGA**

**MIEMBROS DEL TRIBUNAL**

**CALIFICACIÓN**

Biol. Mónica Armas Soto, MSc.  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

.....

Biol. Félix Man-Ging Freire  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

.....

Biol. Manolo Puente Zamora  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

.....

**SUSTENTACIÓN Y DEFENSA DEL TRABAJO INDIVIDUAL DE  
TITULACIÓN REALIZADA EN LA SALA MAESTRÍA DE LA FACULTAD**

**Fecha: .....- certifico**

**Abg. Jorge Solórzano Cabezas  
SECRETARIO FACULTAD**

## DEDICATORIA

Me introduzco a una nueva, diferente y superior etapa de mi vida. Culmino mi Carrera Universitaria, siendo su síntesis la presentación de este mi proyecto de tesis. Sé que del infinito precede la ciencia y la maravilla de mi especialidad y alaba a Dios a quien lo dedico con profundo aprecio y sincero respeto.

A mis amados **padres** por darme su apoyo incondicional. Haber estimulado y promovido el desarrollo de cualidades morales y espirituales que me han permitido tener la maravillosa oportunidad de realizarme como Bióloga.

A mis **hermanos** quienes siempre fraternalmente me animaron a seguir adelante, a mis sobrinos por ser todos, fuente de alegría.

A mis amados **abuelos**, a mi **tía** por estar pendientes en el decurso de mi carrera universitaria.

A ellos dedico este mi esfuerzo y por supuesto al **Biol. Marco Erazo** por tutelarme a vencer los obstáculos en este rumbo y ayudarme a desarrollar las fuerzas necesarias y suficientes que me permitieron materializar esta expectativa añorada, la misma que impulsará el logro de otros más.

A mis **maestros** quienes procuraron dar lo mejor de ellos a mi favor, impregnaron en mi corazón la vehemencia para hacer del sueño una presente realidad.

## AGRADECIMIENTO

El tiempo ha pasado raudo: hoy me despido de las aulas de la Escuela de Biología, admiro y alabo, de todos mis maestros que estimularon y promovieron en mi mente y corazón el amor a la ciencia de la Biología que me llevaron de la mano a apreciar la maravilla de la creación manifestada en su detalle perfecto ante los ojos del investigador.

Agradezco a mi **DIOS**: fuerza activa de vida, cuya bondad inmerecida insufló en el numen y corazón de mis profesores y tutores su paciencia permitiéndome llegar a esta meta final.

A la **UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**, Facultad de Ciencias Naturales, Escuela de Biología por la formación académica brindada a través de sus docentes durante mi vida universitaria.

Agradezco al **Dr. FRANCISCO RATTI**, MSc. Director de Tesis, por sus comentarios útiles durante la revisión y elaboración de esta tesis.

Agradezco de manera infinita al, **Dr. LUIGGI MARTINI ROBLES**, Ex - Jefe del Laboratorio del Subproceso de Parasitología del INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA (INSPI) por abrirme las puertas y facilitarme la realización de esta investigación, sobre todo por brindarme su dirección, paciencia y confianza a lo largo de este proceso: su ayuda hizo posible ejecutarla y culminarla.

De igual manera agradecer al Co-Director de Tesis señor **Dr. LUIS SOLÓRZANO ÁLAVA** por su colaboración en este proyecto.

Gracias, al Equipo Técnico Multidisciplinario del Laboratorio del Subproceso Parasitología del INSPI porque siempre estuvieron prestos con sus consejos oportunos y confianza brindada para la realización de este trabajo.

Al **Ing. GUILLERMO BAÑOS**, por su colaboración en la revisión del análisis estadístico y recomendaciones en la preparación de la tesis.

Al **Biol. FÉLIX MAN-GING FREIRE** por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, experiencia y paciencia ha logrado un aporte invaluable en la elaboración de esta investigación.

A **mis PADRES** quienes con su amor genuino en todo momento me apoyaron a lo largo de mi formación académica y Pre - Profesional cuidando siempre que no me desvíe de la meta.

A **mis COMPAÑERAS** de banca universitaria, entre otras, ANA AYORA y GUADALUPE ZAPATA quienes siempre me apoyaron sin esperar nada a cambio.

Al **Biol. MARCO ERAZO**, quien de su mano caminé allanando el camino - nada fácil – culminando con la presentación de esta tesis.

## RESUMEN

Con el objetivo de determinar la presencia del parásito *Cryptosporidium* sp. en heces de caracoles terrestres del género *Lissachatina fulica* a través de las técnicas de tinción, se realizó un estudio en la provincia del Guayas y Los Ríos en Ecuador. El número de muestras fue determinado por el método aleatorio realizándose la recolección en días alternados durante la estación lluviosa (Diciembre a Mayo). Se recolectó 411 ejemplares vivos que fueron ubicados en recipientes *ad hoc* con el fin de obtener el material fecal del caracol *L. fulica*.

La detección e identificación del parásito se realizó a través de un análisis coprológico parasitario, utilizando muestras frescas, que fueron analizadas con las técnicas de tinción Ziehl Neelsen modificada, Safranina – Azul de metileno y Giemsa.

De la totalidad de caracoles Gigantes Africanos recolectados en las provincias del Guayas y Los Ríos, el 48,2% corresponde a muestras positivas para la técnica de Ziehl Neelsen modificada, el 17.8% para técnica Giemsa y 14.1% para la técnica de Safranina – Azul de Metileno. Con respecto a la evaluación de las técnicas de tinción los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el método de ANOVA, demostrando que existe una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre las técnicas aplicadas. En los resultados obtenidos se destaca la técnica Ziehl Neelsen modificada que demuestra mejor desempeño en la detección de ooquistes *Cryptosporidium* sp. en relación con las otras dos empleadas.

El *Cryptosporidium* sp. se encuentra permanentemente interactuando con el medio ambiente y hospederos, su aparición en el caracol como reservorio natural estaría participando en la diseminación de esta parasitosis en diferentes zonas urbanas y rurales, relacionadas principalmente con la época lluviosa de las provincias estudiadas.

## SUMMARY

With the aim of determining the presence of *Cryptosporidium* sp. stool of land snails of the genus *Lissachatina fulica* through staining techniques, a study was conducted in the province of Guayas and Los Ríos in Ecuador. The number of samples was determined by the random collection method performed on alternate days during the rainy season (December to May). 411 live specimens were placed in *ad hoc* containers to obtain the fecal material collected *L. fulica* snail.

The detection and identification of the parasite was performed through a parasitic stool analysis, using fresh samples, which were analyzed with Ziehl Neelsen staining techniques modified, Safranina - methylene blue and Giemsa.

Of all Giant African snails collected in the provinces of Guayas and Los Rios, 48.2% were positive for Ziehl Neelsen modified samples, 17.8% to 14.1% and Giemsa technique for technique Safranina - Methylene blue. With regard to the evaluation of staining techniques the results were statistically analyzed using ANOVA method demonstrating that there is a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the applied techniques. The results obtained Ziehl Neelsen modified technique showing better performance in the detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts stands in relation to the other two employees.

*Cryptosporidium* sp. is constantly interacting with the environment and host, its appearance in the snail as natural reservoir would be participating in the dissemination of this parasite in different urban and rural areas, mainly related to the rainy season of the provinces studied.

# INDICE GENERAL

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
Portada.....	i
Derecho de autor.....	ii
Director y Co-Director de tesis.....	iii
Hoja de aprobación del tribunal.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Resumen.....	viii
Summary.....	ix
Índice general.....	x
Índice de tablas.....	xiii
Índice de figuras.....	xiv
Índice de anexos.....	xv
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Generalidades.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Taxonomía.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Morfología.....</b>	<b>7</b>
<b>2.4. Ciclo Biológico.....</b>	<b>8</b>
<b>2.5. Epidemiología.....</b>	<b>11</b>
2.5.1. El Parásito.....	11
2.5.2. El Hospedero.....	11
2.5.2.1. Humano.....	11
2.5.2.2. Animales.....	13
2.5.2.3. Alimentos.....	14
2.5.3. El Medio Ambiente.....	15
<b>2.6. Transmisión.....</b>	<b>17</b>
<b>2.7. Detección e Identificación.....</b>	<b>17</b>

2.7.1. Métodos Clásicos.....	18
2.7.2. Métodos Inmunológicos.....	18
2.7.3. Métodos Moleculares.....	18
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
4.1. Objetivo General.....	19
4.2. Objetivos Específicos.....	19
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>5.1. Materiales.....</b>	<b>20</b>
5.1.2. Materiales de Campo.....	20
5.1.3. Materiales y Equipos de Laboratorio.....	20
5.1.4. Reactivos.....	22
5.1.5. Instalación.....	22
<b>5.2. FASE UNO: Métodos de Campo.....</b>	<b>23</b>
5.2.1. Antecedentes del Área de Estudio.....	23
5.2.2. Ubicación Geográfica.....	23
5.2.2.1. Guayas.....	23
5.2.2.2. Los Ríos.....	25
5.2.3. Determinación de los Puntos de Muestreo.....	26
5.2.4. Estimación de la Cantidad de Muestra.....	27
5.2.5. Transporte y Manejo del Organismo Biológico.....	27
5.2.6. Descripción de Factores Ambientales en Fase de Campo.....	29
<b>5.3. FASE DOS: Método de Laboratorio.....</b>	<b>30</b>
5.3.1. Preparación del Material biológico en el Laboratorio.....	30
5.3.2. Procesamiento de la Muestra .....	30
5.3.2.1. Técnica Empleada: Análisis en Fresco.....	30
5.3.2.2. Técnica Empleada: Concentración.....	32
5.3.2.3. Técnica Empleada: Fijación.....	33
5.3.3. Preservación de la Muestra .....	35

5.4. ANÁLISIS DE DATOS.....	35
6. RESULTADOS.....	36
7. DISCUSIÓN.....	42
8. CONCLUSIONES.....	46
9. RECOMENDACIONES.....	47
10. GLOSARIO DE TÉRMINOS TÉCNICOS.....	48
11. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	50
12. ANEXOS.....	58

## LISTA DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Tabla 1.</b> Especies reconocidas de <i>Cryptosporidium</i> , su huésped y diferenciación del rango de tamaño	.....6
<b>Tabla 2.</b> Registro de los factores ambientales obtenidos de las zonas muestreadas. Datos mensuales proporcionados por el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI)	.....28

## LISTA DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Ooquiste de <i>Cryptosporidium</i> sp. de 5 µm en heces de caracol Gigante Africano, tinción de Ziehl Neelsen modificada	.....7
<b>Figura 2.</b> Ooquiste de <i>Cryptosporidium</i> sp. liberando merozoítos y esporozoítos “desnudos” en el borde de las microvellosidades intestinales	.....8
<b>Figura 3.</b> Situación intracitoplasmática de un <i>Cryptosporidium</i> en una vacuola parasitófora del enterocito	.....9
<b>Figura 4.</b> Ciclo biológico del <i>Cryptosporidium</i> sp.	.....10
<b>Figura 5.</b> Mapa físico del Guayas - Modificado.	.....24
<b>Figura 6.</b> Mapa físico de Los Ríos – Modificado.	.....26
<b>Figura 7.</b> Colocación y extendido de la muestra.	.....31
<b>Figura 8.</b> Modo de observación de la muestra.	.....31
<b>Figura 9.</b> Forma sistemática del extendido para las tinciones con objetivo de 100X.	.....34

## LISTA DE ANEXOS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Anexo 1.</b> Ficha de campo para la descripción de los parámetros físicos/ biológicos en la recolección del <i>Lissachatina fulica</i> .	.....58
<b>Anexo 2.</b> Ficha del manejo de los caracoles <i>Lissachatina fulica</i> para la identificación de <i>Cryptosporidium</i> sp. en el laboratorio de parasitología del INSPI.	.....59
<b>Anexo 3.</b> Protocolo para la identificación de <i>Cryptosporidium</i> sp. en heces de caracol <i>Lissachatina fulica</i> : Tinción de Ziehl Neelsen modificada	.....60
<b>Anexo 4.</b> Protocolo para la identificación de <i>Cryptosporidium</i> sp. en heces de caracol <i>Lissachatina fulica</i> : Tinción de Safranina – Azul de Metileno	.....61
<b>Anexo 5.</b> Protocolo para la identificación de <i>Cryptosporidium</i> sp. en heces de caracol <i>Lissachatina fulica</i> : Tinción de Giemsa.	.....62
<b>Anexo 6. FASE UNO: CAMPO</b> Reconocimiento de las áreas afectadas por la presencia de los caracoles <i>Lissachatina fulica</i> en los diferentes cantones.	.....63
<b>Anexo 6.1.</b> Toma de datos.	.....64

<b>Anexo 6.2.</b>	Colaboración de los moradores de los sectores muestreados.	.....65
<b>Anexo 6.3.</b>	Presencia de animales.	.....66
<b>Anexo 6.4.</b>	Pequeños cultivos.	.....67
<b>Anexo 6.5.</b>	Convivencia con las personas.	.....68
<b>Anexo 6.6.</b>	Adaptación del comportamiento.	.....69
<b>Anexo 7.</b>	<b>FASE DOS: LABORATORIO</b>	
	Proceso básico para las tinciones.	.....71
<b>Anexo 8.</b>	<b>Fase Dos:</b> Identificación microscópica de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> sp.	.....75
<b>Anexo 8.1.</b>	Identificación microscópica de ooquistes <i>Cryptosporidium</i> sp. con la tinción de Ziehl Neelsen modificada.	.....76
<b>Anexo 8.3.</b>	Identificación microscópica de artefactos con la tinción de Ziehl Neelsen modificada	.....78
<b>Anexo 8.4.</b>	Identificación microscópica de ooquistes <i>Cryptosporidium</i> sp. con la tinción de Safranina – Azul de metileno.	.....79
<b>Anexo 8.5.</b>	Identificación microscópica de ooquistes <i>Cryptosporidium</i> sp. con la tinción de Giemsa.	.....80

**Anexo 8.6. Control en Humano**

Identificación ooquistes de *Cryptosporidium* sp.  
por técnica de tinción de Ziehl Neelsen modificada. ....**81**

**Anexo 8.7. Control en Humano**

Identificación ooquistes de *Cryptosporidium* sp.  
por técnica de tinción de Safranina – Azul de metileno. ....**82**

**Anexo 8.8. Control en Humano**

Identificación ooquistes de *Cryptosporidium* sp.  
por técnica de tinción de Giemsa. ....**83**

# 1. INTRODUCCIÓN

La introducción accidental o intencional de especies exóticas e invasoras sin protocolos adecuados de manejo, debido principalmente a la necesidad de importar especímenes para potenciar la producción agropecuaria, acuícola y diversos fines comerciales, es la principal causa de erosión genética y pérdida de biodiversidad a escala mundial (Olmedo *et al.*, 2011).

En Ecuador, a pesar de su extensión territorial relativamente pequeña posee una alta concentración de riqueza biológica tanto en flora y fauna endémica, pero la introducción de especies exóticas e invasoras ha provocado un gran deterioro de ésta biodiversidad, dado a que logran establecerse generando competencia por recursos geográficos y de sustento con las especies nativas que no pueden desarrollarse adecuadamente.

En los últimos años, entre las especies exóticas e invasoras existentes en el Ecuador, una de las que ha causado impacto en varios sectores como el agrícola, salud pública y ecológico, es el llamado Caracol Gigante Africano – *Lissachatina fulica* traído inicialmente para fines comerciales.

En el 2005, se detectó la presencia de este molusco en varias Provincias de la Costa Ecuatoriana, especialmente en Esmeraldas (Correoso, 2006). Transcurrido el tiempo y sin intervención de las autoridades pertinentes, este tipo de caracol se convirtió en una importante plaga competitiva para nuestros ecosistemas debido a su tipo de alimentación polífaga, desplazándose masivamente a jardines, parques, zonas rurales, zonas urbanas, inclusive ya coexistiendo como parte de la vida rutinaria de las personas.

Las consecuencias generadas por *Lissachatina fulica* han repercutido en todas las áreas ya mencionadas, pero un punto crítico es el impacto a la salud humana debido a la facultad propia del caracol de hospedar diferentes grupos zoológicos patógenos como es el caso del nematodo *Angiostrongylus cantonensis*, causante de la meningoencefalitis eosinofílica, reportado en Guayaquil en el 2008, por la ingesta de caracoles crudos, estudiado por el

Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) (Martini *et al.*, 2009) el cual ha identificado su presencia en los caracoles *Lissachatina fulica* en 12 de las 24 Provincias del Ecuador (MSP del Ecuador, 2012), esta especie también se encuentra relacionada con el comienzo de cuadros de gastroenteritis, ya que al estar en contacto directo con ambientes contaminados con *Cryptosporidium* sp., pueden adquirir el parásito y ocasionar diarreas acuosas como lo demuestra una investigación realizada en Brasil (Schiffler *et al.*, 2008).

El ***Cryptosporidium* sp.** es un agente patógeno, protozooario coccidio intracelular que se desarrolla y multiplica tanto en las células epiteliales de los sistemas digestivos y respiratorios de los vertebrados (Arias *et al.*, 2008), así como también, en órganos anexos de invertebrados (Cabrera *et al.*, 2010); una zoonosis de transmisión fecal-oral producida tras la ingestión de ooquistes de *Cryptosporidium* excretados en las heces de animales o humanos (García *et al.*, 2004). La gran resistencia que presenta a los factores ambientales le permite una distribución geográfica mundial de importancia en la medicina humana y veterinaria (Neira *et al.*, 2010a; Hurtado *et al.*, 2010); esta infección puede transmitirse de forma esporádica, de animal a persona, de persona a persona, a través del agua, alimentos contaminados con material fecal o por contacto con superficie medio ambientales contaminados (Chacón, 2012); reportándose casos de criptosporidiosis en varios países con una alta morbilidad (casi 100%) y mortalidades dependientes del nivel de gravedad de la enfermedad, la edad del hospedador y la presencia de otros patógenos, pudiendo ser un autolimitante en individuos inmunocompetentes y fatal en aquellos individuos inmunodeprimidos o en condiciones de estrés (Arias *et al.*, 2008).

En el Litoral Ecuatoriano con la presencia de la época lluviosa se incrementa la población del caracol Gigante Africano (*Lissachatina fulica*), haciéndolos más visibles y notorios para la manipulación directa, sin ningún tipo de precaución debido a su aspecto inofensivo, estos son consumidos ya sean crudos o semi-cocidos, creando el ambiente propicio para las transmisiones parasitarias en la salud pública, debido a la posible infestación de dicho parásito, lo que

traería como consecuencia la aparición de brotes epidémicos provocando impacto no solo a nivel de la salud humana y animal, sino también económico - productivo. Todos estos factores han permitido abordar la identificación de este parásito, basándose en características morfométricas como: color, forma y tamaño de su estructura a través de técnicas de tinciones empleadas para su identificación constituyendo una herramienta adecuada y accesible para realizar la detección del mismo. Existen actualmente herramientas más avanzadas que son las pruebas moleculares, empleadas por su alta sensibilidad para detectar estos tipos de parásitos. Sin embargo, cuando no se cuenta con la tecnología e infraestructura adecuada para implementarlas, siguen siendo las tinciones las herramientas básicas e indispensables.

Por las mencionadas consecuencias se justifica la utilidad y relevancia del estudio para contribuir en las actividades de desarrollo e investigación científica siendo un aporte para las autoridades competentes en garantizar a la población las medidas preventivas para disminuir dicho riesgo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 GENERALIDADES

Entre las enfermedades parasitarias intestinales reemergentes con interés médico y veterinario nos encontramos con la criptosporidiosis producido por el género *Cryptosporidium*.

La primera descripción publicada de un parásito semejante al *Cryptosporidium* fue hecha por Clarke en 1895 en el epitelio de la mucosa gástrica de ratones asintomáticos de laboratorios, pero no fue hasta 1910 cuando a través de un microscopio con límite de resolución, pudo describirlo con gran detalle (Díaz *et al.*, 1996).

Aunque Clarke pasó a la historia de la criptosporidiosis, fue Ernest Edward Tyzzer en 1907, quien publicó muchos trabajos y propuso primero el nombre de *Cryptosporidium*, descubrió también el ciclo biológico (Rojo, 2009) en el tracto intestinal de ratones de laboratorio. En 1955 Slavin señala a éste protozoo como *C. meleagridis* causante de diarrea en pavos y, 1970 se comprobó su presencia infectando ganado bovino, cuando se empezó apreciar su importancia en veterinaria (Navarro *et al.*, 2011).

En 1976 fue reconocido como causante de la enfermedad de la criptosporidiosis en humanos, pero solo en 1982 toma relevancia, cuando el número de casos detectados empezó a incrementarse rápidamente junto con el SIDA (Ocampo *et al.*, 2011). Este hecho, hizo suponer que este protozoo infectaba a pacientes con alteraciones del sistema inmunológico, considerándolo como un patógeno oportunista en pacientes tratados, con corticoterapia y antitumorales, en la insuficiencia renal y en la diabetes mellitus, capaz de producir manifestaciones clínicas de extrema gravedad a estos pacientes (Díaz *et al.*, 1996; Martínez, 1999), ya que el mecanismo de infección es vía fecal – oral, por contacto directo de hospedador – hospedador, alimentos o el agua contaminadas; por último también se ha comprobado la transmisión

por inhalación, vía aerosoles o gotitas de exudaciones al toser y estornudar (Sanz, 2010).

Desde entonces, numerosas investigaciones epidemiológicas se han realizado sobre *Cryptosporidium*, acerca de cómo este protozoo se encuentra altamente extendido en el mundo, debido a que la forma infectante de este coccidio es el ooquiste maduro, presenta una gran resistencia a los factores ambientales lo que le permite una amplia distribución en la naturaleza (Neira *et al.*, 2010a), afectando como enfermedad zoonótica a humanos y animales desde hace más de 30 años hasta la actualidad.

## **2.2 TAXONOMIA**

El carácter zoonótico del *Cryptosporidium* ha permitido el estudio de diversos hospederos ya sea vertebrados e invertebrados, permitiendo que se incluya varias especies distintas de *Cryptosporidium* basándose en las características morfológicas de los ooquistes, hospedador preferido y tejido preferente de asentamiento. Sin embargo, su número ha ido disminuyendo a medida que se profundizaba en su conocimiento y hoy son solo 13 especies válidas identificadas por las técnicas moleculares (Tabla 1) (Sanz, 2010; Gracia *et al.*, 2004; OIE, 2004).

Debido a la incorporación de esta nueva técnica molecular, la taxonomía ha ido variando, llegando al reconocimiento que el parásito no es especie - específico y que puede transmitirse de una especie a otra (Acha & Szyfres, 1989) permitiendo conocer que la mayor parte de las especies y genotipos demuestran adaptación, y no necesariamente especificidad de huésped dando como resultado numerosos hospedadores infectados por producirse transmisión cruzada, sobre todo cuando los animales comparten un mismo hábitat (Del Coco & Basualdo, 2008).

A partir de estas observaciones se lo clasifica taxonómicamente dentro de:

**Reino:** Protista

**Phylum:** Apicomplexa

**Clase:** Conoidasida & Coccidia

**Subclase:** Coccidiasina

**Orden:** Eucoccidiorida

**Suborden:** Eimeriorina

**Familia:** Cryptosporidiidae

**Género:** *Cryptosporidium* (Godoy, 2011; Medina *et al.*, 2012).

**Especie:** spp.

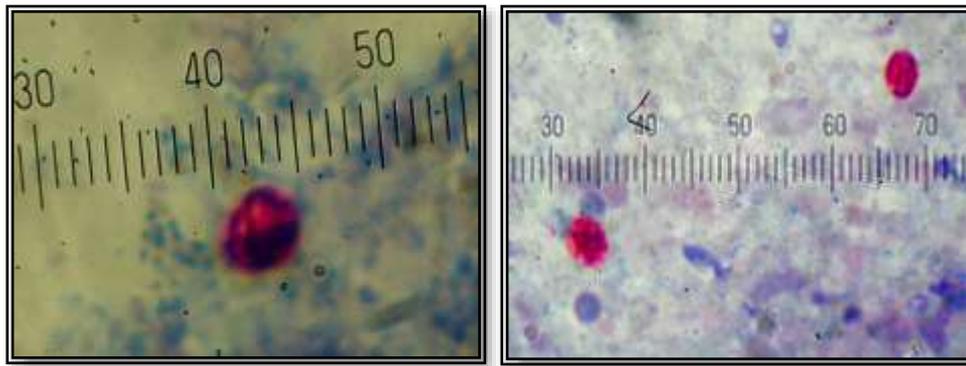
**Tabla 1.** Especies reconocidas de *Cryptosporidium*, su huésped y diferenciación del rango de tamaño.

Especies de <i>Cryptosporidium</i>	Tamaño medio del oocisto ( $\mu\text{m}$ ) y (rango de tamaño)	Lugar de infección	Hospedador
<i>C. parvum</i>	5.5 × 4.5 (3.8–6.0 × 3.0–5.3)	Intestino delgado	Mamíferos
<i>C. muris</i>	7.5 × 5.0 (6.5–8.0 × 5.0–6.5)	Estómago	Ratones
<i>C. andersoni</i>	7.4 × 5.6 (6.6–8.1 × 5.0–6.5)	Estómago	Ganado vacuno
<i>C. felis</i>	4.5 × 5.0 4.6 × 4.0 (3.2–5.1 × 3.0–4.0)	Intestino delgado	Gatos
<i>C. canis</i>	5.0 × 4.7 (3.7–5.9 × 3.7–5.9)	Intestino delgado	Perros
<i>C. wrairi</i>	5.4 × 4.6 (4.8–5.6 × 4.0–5.0)	Intestino delgado	Cobayas
<i>C. baileyi</i>	6.2 × 4.6 (5.6–6.3 × 4.5–4.8)	Tráquea, bolsa of Fabricio, cloaca	Aves gallináceas
<i>C. meleagridis</i>	5.2 × 4.6 (4.5–6.0 × 4.2–5.3)	Intestino	Pavos
<i>C. serpentis</i>	6.2 × 5.3 (5.6–6.6 × 4.8–5.6)	Estómago	Serpientes
<i>C. saurophilum</i>	5.7 × 4.7 (5.3–5.7 × 4.2–5.7)	Mucosa intestinal y cloacal	Lagartos
<i>C. nasorum</i>	3.6 × 3.6 4.3 × 3.3 (3.5–4.7 × 2.5–4.0)	Intestino	Peces
<i>C. molnari</i>	4.7 × 4.5 (3.2–5.5 × 3.0–5.0)	Intestino	Peces
<i>Cryptosporidium</i> sp.	4.5–6.0 × 3.6–5.6	Intestino delgado	Codomiz
<i>Cryptosporidium</i> sp.	5.8–5.0 × 8.0–5.6	? Intestino	Serpientes, reptiles

**Fuente:** Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004.

## 2.3 MORFOLOGIA

La forma infectiva y único estado exógeno de *Cryptosporidium* corresponde al ooquiste, elemento de resistencia del parásito que permite la diseminación de la infección (Del Coco & Basualdo, 2008), aparece como una estructura esférica o ligeramente ovoide que mide de 4 a 6 o de 3 a 8 micras de diámetro (Chacón, 2012; Navarro *et al.*, 2011).



**Fig. 1.** Ooquiste de *Cryptosporidium sp.* de 5  $\mu\text{m}$  en heces de caracol Gigante Africano (*Lissachatina fulica*), tinción de Ziehl Neelsen modificada.

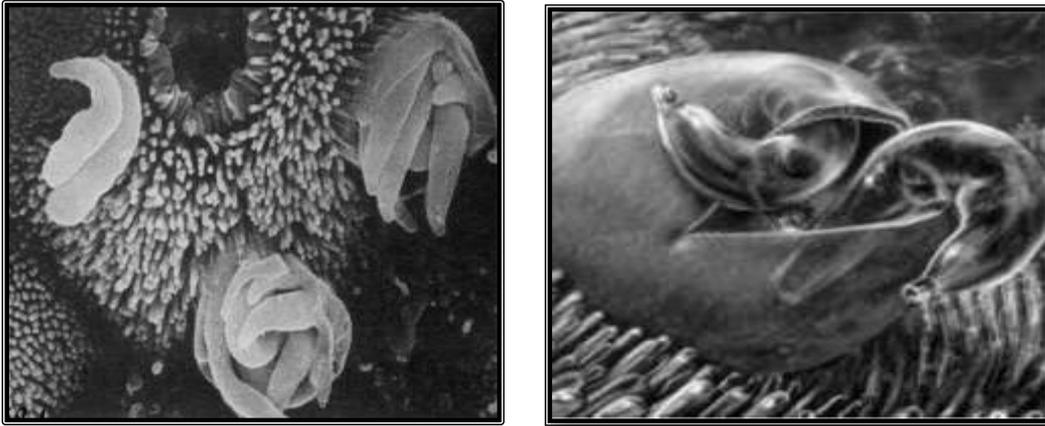
**Autor:** Biutty Cazorla Caicedo.

Este al ser observado en microscopía de contraste de fase, se observa una pared lisa e incolora que puede ser fina o gruesa, lo que estaría relacionado con diferentes vías de desarrollo esporogónico y de infección. Dicha pared está compuesta por tres capas visibles al microscopio electrónico de transmisión. La capa externa compuesta por abundante material filamentoso y glicoproteínas ácida; puede ser parcialmente removida por efecto del hipoclorito de sodio. La capa central electrodensa, rígida de composición lipídica que le confiere propiedades de ácido alcohol resistencia y la capa *interna* presenta una composición glicoproteica.

El ooquiste presenta una sutura en su pared la cual le permite la salida de los esporozoítos durante el desenquistamiento.

En su interior posee una estructura interna formada por 4 esporozoítos vermiformes y cuerpos residuales que no son claramente visibles. Los

esporozoítos presentan un extremo anterior ligeramente puntiagudo y el posterior redondeado (Fig. 2). Miden aproximadamente entre 5 a 1  $\mu\text{m}$ , un núcleo prominente que se localiza en el tercio posterior del cuerpo. Dentro del ooquiste los esporozoítos se disponen de forma paralelas entre sí, con el extremo anterior adyacente al polo donde nace la sutura (Llop *et al.*, 2001; Del Coco & Basualdo, 2008; Flores *et. al.*, 2010).



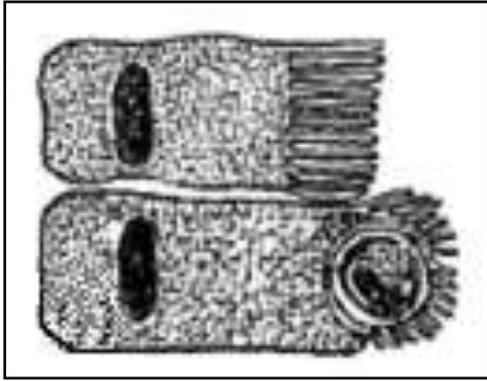
**Fig. 2.** Ooquiste de *Cryptosporidium* spp. liberando merozoítos y esporozoítos “desnudos” en el borde de las microvellosidades intestinales.

**Fuente:** [http://parasite.org.au/pughcollection/Cryptosporidium%20parvum%201%2009.jpg\\_Index.html](http://parasite.org.au/pughcollection/Cryptosporidium%20parvum%201%2009.jpg_Index.html)

## 2.4 CICLO BIOLÓGICO

Las especies del género *Cryptosporidium*, como el de otros coccidios son organismos monoxenos, es decir, completan todo su ciclo en un solo hospedador (Chacón, 2012).

El ciclo biológico inicia con la ingestión de estos ooquistes o según algunos investigadores por aspiración, con la liberación de los esporozoítos una vez que estos llegan al intestino, liberan los esporozoítos, penetran en las células enteroepiteliales, pasando a su citoplasma superficial, englobados por la membrana plasmática de la misma, que les rodea y aísla del citoplasma formando la vacuola parasitófora (Fig.3).



**Fig. 3.** Situación intracitoplasmática de un *Cryptosporidium* en una vacuola parasitófora del enterocito.

**Fuente:** Tomada de [boks.google.com.ec/books?isbn=8447531414](https://books.google.com.ec/books?isbn=8447531414)

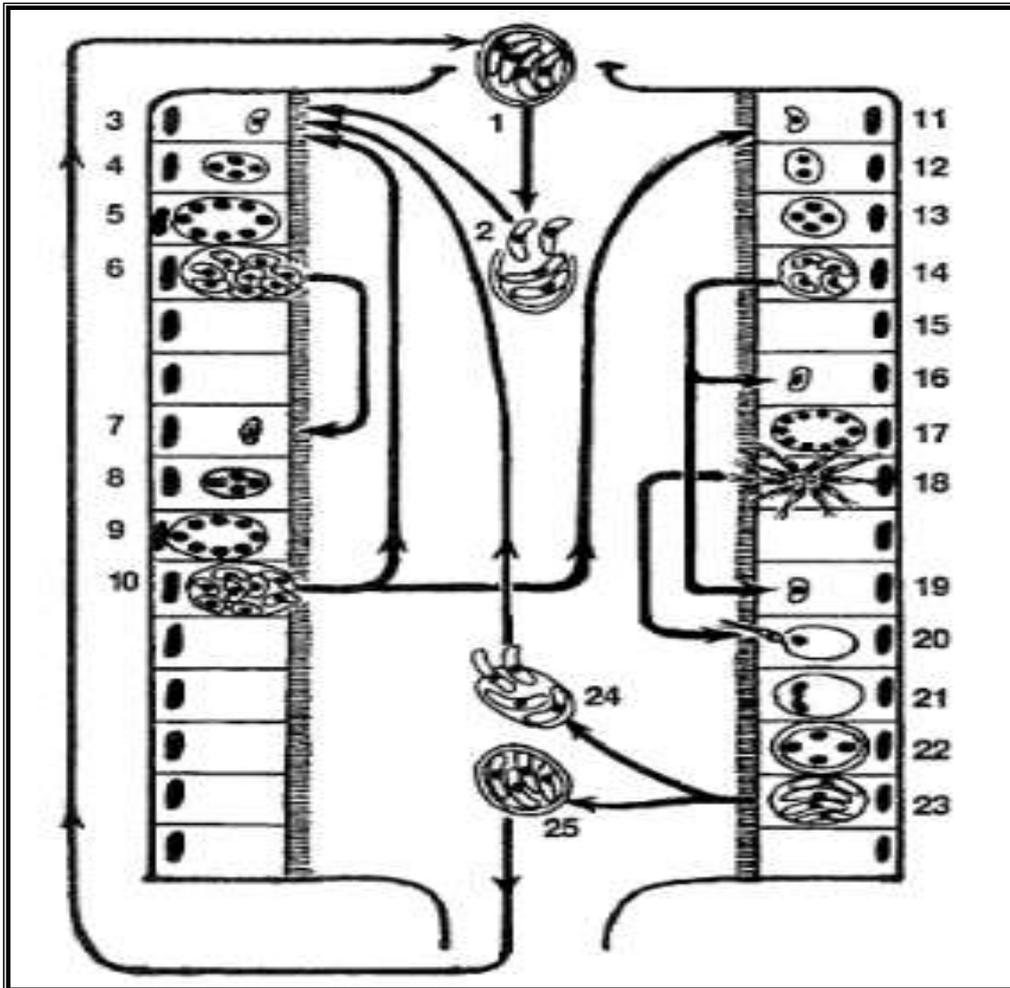
Inician allí un **primer ciclo merogónico** que da origen a **8 merozoitos** que, por rotura de la célula hospedadora, quedan libres en la luz del intestino y que, penetrando en nuevas células enteroepiteliales, inician un **segundo ciclo merogónico** que se diferencia del anterior por dar origen cada meronte a tan sólo 4 merozoitos.

A partir de las formas resultantes del mismo, y tras invadir éstas a nuevas células, tiene lugar el **ciclo gamogónico**. Los microgamontes dan cada uno origen a **14-16 microgametos flagelados** que quedan libres y pasan a fecundar a los **macrogametos** alojados todavía en otros enterocitos. Una vez realizada la fecundación, se forma la cubierta ooquistica alrededor de los cigotos, dando lugar a **dos tipos de ooquistes**, ambos conteniendo 4 esporozoítos al madurar.

Unos de estos **ooquistes**, dotados de **gruesa pared**, arrastrados por el contenido intestinal y evacuados al exterior con la defecación, tendrán a su cargo la infección de nuevos hospedadores por vía oral, a través de un **ciclo de infestación exógeno** (Fig.4) (Gállego, 2006).

Los **ooquiste del segundo tipo**, no presentes en las defecaciones, se distinguen de los anteriores por su **fina pared** y por dejar en libertad a los esporozoítos en la luz intestinal. Estos esporozoítos, al penetrar en otras células enteroepiteliales, dan lugar a un **ciclo de autoinfección endógeno**, porque a partir de ellos se originan nuevos ciclos merogónicos, gamogónicos y esporogónicos que, a través de su sucesión indefinida, son responsables de una prolongada persistencia del parasitismo, si bien este proceso sólo se

prolonga en sujetos afectados por un estado de inmunodepresión, en tanto que es autolimitada en aquellos cuyo estado inmunitario es normal, o sea en sujetos inmunocompetentes (Gállego, 2006).



**1-2** Ingestión del ooquiste y liberación de los esporozoítos; **2-3** Penetración de los esporozoítos en los enterocitos; **3-10** Ciclos agamogónicos productores de ocho merozoítos; **10-11** Paso de estos merozoítos a nuevos enterocitos **11-14** Con agamogonía, productora de tan solo cuatro merozoítos; **16 o 19** entrada de nuevos enterocitos; **14-18** Dan origen a ciclos gamogónicos productores de microgametos masculinos; **19** o a un solo macrogameto. **20** La singamia, **21** da origen a un cigoto que **21-23** por esporogonia **24** y enquistamiento de dos tipos de ooquiste: uno de ellos, de cubierta fina **24-2** pueden invadir nuevos enterocitos, responsable de ciclos de autoinfecciones en el mismo hospedador; los otros, **25** de gruesa cubierta, responsables, al pasar al medio exterior, **25-1** responsable de la infección de nuevos hospedadores al ser ingeridos por éstos.

**Fig. 4.** Ciclo biológico del *Cryptosporidium*.

**Fuente:** Tomada de [books.google.com.ec/books?isbn=8447531414](https://books.google.com.ec/books?isbn=8447531414)

## 2.5 EPIDEMIOLOGÍA

### 2.5.1. EL PARÁSITO

El *Cryptosporidium*, es un género que presenta características epidemiológicas particulares. Es un parásito monoxeno de distribución cosmopolita. El principal mecanismo de infección es la ingestión de ooquistes esporulados, por contacto directo o indirecto con el hospedador. La dosis infectiva es baja, los ooquistes no requieren de maduración exógena una vez eliminados y tienen una supervivencia de 18 meses en condiciones húmedas y frías, durante los cuales pueden permanecer viables (Del Coco & Basualdo, 2008).

### 2.5.2. EL HOSPEDERO

Dentro de este parámetro los hospedadores para el género *Cryptosporidium* es realmente amplio, en la actualidad se lo ha descrito en varias especies y responsable de muchos brotes por todo el mundo. Invadiendo preferentemente células del tracto gastrointestinal e incluso del respiratorio en ciertas circunstancias (Chacón, 2012). Es así que podemos encontrarlos como hospedadores susceptibles:

#### 2.5.2.1. HUMANO

En el **Hombre**, las diferencias son muy marcadas dependiendo del grado de desarrollo de cada país, por lo que tenemos una prevalencia estimada de *Cryptosporidium* en personas con diarrea del 1 al 3% en países desarrollados y alrededor del 10% en países en vías de desarrollo. En niños con diarrea, se evidencia en el 7% de los casos en países desarrollados, mientras que la proporción es mayor, con un 12% en países en vías de desarrollo (Del Coco & Basualdo, 2008).

La prevalencia en la criptosporidiosis en Sudamérica varía en porcentajes que oscilan entre el 0.4% obtenido en un centro sanitario de Chile y hasta un 40% en una población infantil en el altiplano Mejicano, más afectados son los niños menores de cinco años con cuadros diarreicos graves y estado nutricional deficiente (Vergara & Quílez, 2004), como en algunos casos observados en: Venezuela, Ciudad de Bolívar con elevada prevalencia en pacientes infectados con el VIH, dentro de la cuales se observó un 34.1% para *Cryptosporidium parvum* (Godoy, 2011). Otro estudio realizado en el Estado de Zulia, Venezuela, se investigó la prevalencia de criptosporidiosis en niños asintomáticos menores de 6 años con los factores de riesgo con tres tipos de muestreos (muestra fecal) con un intervalo de 20 días, en sectores no marginales osciló valores 13.3%, 23.3% y 6.6%; y en la zonas marginales fue entre 29.1%, 20.8% y 4.1% practicándose exámenes frescos, concentración y frotis con Ziehl Neelsen modificada (Díaz *et. al.*, 1996).

En Chile, se realizó un diagnóstico por infección de *Cryptosporidium parvum* en una mujer embarazada inmunocompetente con riesgo ocupacional, fue examinada junto con sus gatos, en el que resultó positivo y se reportó como el primer caso por contagio de su animal domestico en este país (Neira *et. al.*, 2010a).

En la ciudad de Medellín, Colombia, los porcentajes de infección oscilan entre 4% en niños con diarrea y un 5.1% en la ciudad de Cali en niños menores de 14 años (Vergara & Quílez, 2004). En el distrito de Lima- Metropolitana, Perú, se han realizado estudios para conocer la prevalencia de la criptosporidiosis en pacientes diarreicos encontrándose un 0.14% entre 3 y 70 años. Además, se ha realizado un estudio de prevalencia con el 8.6% para *Cryptosporidium parvum* en el Instituto Nacional de Salud, Centro de Salud Villa Sr. De los Milagros del Callao, Hospital Nacional Egdardo Rebagliati Martins y Hospital San José del Callao en pacientes con diarrea, comprendidos entre las edades de 3 y 62 años, para lo cual se utilizó el método directo, concentración por sedimentación de Ziehl Neelsen (Tananta, 2004).

En Ecuador, Provincia de Chimborazo presenta una prevalencia de parasitismo en niños quechuas de zonas rurales montañosas donde se reportó un 8.9% para *Cryptosporidium parvum* (Jacobsen *et al.*, 2007).

#### 2.5.2.2. ANIMALES

En los **Animales**, el hallazgo de este coccidio patógeno se inicia su estudio hace ya varias décadas, descubriéndose con el tiempo muchas especies en varios hospederos, tomándola como herramienta de investigación la medicina humana y veterinaria, la cual ha evidenciado gran número de investigaciones de interés económico y para la salud humana. Por lo que, se ha descrito desde el punto veterinario que los rumiantes domésticos, son los más frecuentemente afectados y en los que se considera como uno de los agentes etiológicos más frecuentes del síndrome de diarrea neonatal, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas como consecuencia de mortalidad que produce y el retraso del crecimiento de los animales en recuperación (Vergara & Quílez, 2004).

En Vermont, New York, Pennsylvania, Maryland, Virginia, North Carolina y Florida se encontró la presencia de *Cryptosporidium parvum*, *C. bovis* y *C. andersoni* en estudios realizado en 541 vacas en ordeño en 2 granjas de cada localidad con una prevalencia de 0.4%, 1.7% y 3.7%, respectivamente (Aguilar, 2007).

En el Ecuador, se investigó las enfermedades protozoaricas gastrointestinales en bovinos pertenecientes a la comunidades del proyecto MICUNI en la que reflejó una incidencia alta, media y baja de 78.19%, 14.38% y 7.43% respectivamente en vacas, vaconas y terneros (Chicaiza, 2005).

Por otra parte, en la Provincia del Chaco, Argentina se realizó la detección de *Cryptosporidium parvum* en 33 ejemplares de carpincho (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) en cautiverio, dando como resultado el 18% de positividad (Sarmiento *et al.*, 2004). En la provincia de Buenos Aires, a través

de un estudio realizado en animales domésticos y monos de un zoológico, se determinó el 19.46% de *C. parvum* de 375 muestras por medio de las técnicas Ritchie modificada y Ziehl Neelsen modificada (Venturini *et al.*, 2006).

En Playa Dorada, Boca de Aroa, Estado Falcón, Venezuela, se realizó un estudio de infección sistémica por *Herpes virus* complicada con *Cryptosporidium* spp., en un delfín manchado del Atlántico (*Stenella frontalis* Cuvier, 1829), localizado en el intestino grueso, por el método de diagnóstico histopatológico teñido con la coloración básica de hematoxilina- eosina (H-E) presenciándose infiltración de células inflamatorias en la base de las criptas (Arias, 2008).

También está documentada la presencia de *Cryptosporidium* spp. en varias especies de bivalvos filtradores de consumo humano (almejas, ostras y mejillones) que acumulan grandes cantidades de ooquistes. La posibilidad de transmisión a humanos a través del consumo es evidente, al constatarse que un 53% de las muestras contaminadas contienen ooquistes viables y que estos son inactivados al utilizarse los habituales métodos de cocción al vapor (Navarro *et al.*, 2011). Sin embargo, se encuentra también detectado en Gasterópodos terrestre. Así, como lo demuestra Chile en un primer estudio realizado sobre *Cryptosporidium parvum* en gasterópodos silvestres como bioindicadores de contaminación fecal, en ecosistemas terrestre evidenciándose 4 lugares positivos para el caracol (*Helix aspersa* Müller, 1774) y 1 caso positivo para la babosa (*Deroceras reticulatum* Müller, 1774) de la región Valparaíso (Neira *et al.*, 2010b).

En cuanto a la infección de *Cryptosporidium* en el caracol Gigante Africano existe una investigación realizada en Brasil que tiene como objetivo aislar en heces de *Lissachatina fulica* o *Achatina fulica* (Bowdich, 1822), en la que se determinó el 52% de positividad de 50 muestras de heces recolectadas en nueve barrios de la municipalidad de Campos dos Goytacaz - RJ, utilizando Ziehl Neelsen modificada, concluyendo que puede participar en la cadena epidemiológica de la criptosporidiosis (Schiffler *et al.*, 2008).

### 2.5.2.3. ALIMENTOS

Los **Alimentos** han demostrado recientemente un papel importante en la transmisión de este parásito, aunque se han demostrado pocos brotes por este medio. En Maine, EEUU solo se ha detectado un solo brote que estuvo asociado con zumo fresco de manzana (García *et al.*, 2004). En el Distrito de Cercado de Lima, obtuvieron un 6,67% para *Cryptosporidium parvum* y entre otros enteroparásitos, tales como, *Giardia* sp. con un 1.9%, *Isospora* sp. con un 3.81% en 105 muestras de Lechuga (*Lactuca sativa*) en locales de comida; otro estudio, expuesto por esta misma autora, en Costa Rica, obtuvo un total de 640 muestras de verduras en mercados, entre ellas, lechuga (*Lactuca sativa*) y cilantro (*Coriandrum sativum*), donde todas presentaron contaminación con ooquistes de *Cryptosporidium* sp. (Tananta, 2004).

En Venezuela, se analizaron verduras que se consumen crudas procedentes del mercado público de Caracas, donde se tomaron 100 muestras entre ellas lechuga (*Lactuca sativa*), de éstas se obtuvo 24% de positividad para ooquistes de *Cryptosporidium* sp.; las muestras fueron procesadas, utilizando cloruro de sodio al 0.85% como líquido de lavado, el método que se utilizó para determinar la presencia del parásito fue siembras en placas de agar, cultivos en medio Boeck - Drbohlav y coloración de Kinjoun (Tananta, 2004).

### 2.5.3. EL MEDIO AMBIENTE

La transmisión ambiental de microorganismos patógenos, constituye un medio altamente efectivo para la diseminación de enfermedades a una gran proporción de la población. La Organización Mundial de la Salud estima que un 24% de las enfermedades que ocurren en el mundo están asociadas con factores ambientales, entre ellos el agua de calidad insegura y precarias condiciones higiénicas (Bentancourt & Querales, 2008).

Con este tipo de factor nos encontramos con la ya documentada infección de mayor consideración a nivel mundial reportada en 1993 en Milwaukee,

Wisconsin, EE.UU. cuando se contaminó la red municipal de abastecimiento de agua, afectando a 400.000 habitantes en la que fallecieron 7 individuos. En Julio- Agosto de 1998, en Sydney (Australia) también se contaminó la red municipal de abastecimiento de agua y, aunque no se reportó ningún caso de la enfermedad, se emitió una recomendación de hervir el agua antes de utilizarla para consumo (Elika, 2004; De La Parte *et al.*, 2005). Otro caso de contaminación ambiental se descubrió en 1994 con la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en aguas de consumo y plantas potabilizadoras de Salamanca, España. Desde entonces se ha realizado varios estudios para detectar los reservorios ambientales y los posibles medios de propagación del parásito a humanos y animales. Entre ellos se ha investigado: aguas de ríos y otras zonas de captación de aguas para consumo, lodo de diques, lodos y aguas procedentes de planta de tratamiento de aguas residuales y potabilizadoras, utilizadas para riego y consumo humano mostrando frecuencia de contaminación entre el 15,4% y el 100 En aguas se ha demostrado la presencia de las principales especies responsables de infección humana (*C. parvum* y *C. hominis*), favoreciendo la aparición de brotes epidémicos, ya descritos. Además, su presencia en aguas de ríos favorece la acumulación de este parásito en animales filtradores, lo que supone un riesgo por transmisión alimenticia, al haberse hallado tanto *C. hominis* como *C. parvum* acumulados en bivalvos criados para el consumo humano (Navarro *et al.*, 2011).

Finalmente los factores climáticos, como la temperatura, las lluvias torrenciales en aguas de ríos se relacionan con elevadas concentraciones de ooquistes de *Cryptosporidium* y *Giardia*. Además, se incluye los sistemas de distribución de las aguas de bebida y de recreo, que condicionan la probabilidad de que los ooquistes se diseminen en el medio ambiente (García, 2004).

Es importante considerar que también se pueden producir enfermedades gastrointestinales debido a los desechos de los animales y humanos que se evacuan en pozos, letrinas abiertas, canales, esparciéndose por las corrientes de agua a tierras de labranza y así de esta forma se produce un alto grado de contaminación ambiental.

## 2.6 TRANSMISIÓN

La transmisión del *Cryptosporidium* sp., producido por contacto directo de ooquistes esporulados es principalmente por la vía fecal - oral, pero pasan inadvertidos otros medios, en los cuales la diseminación de este agente infeccioso puede llegar a afectar al hospedador y varían de acuerdo a la localización geográfica, cultura sanitaria y otras fuentes, que se deben considerar como por ejemplo:

1. La contaminación de vegetales.
2. La contaminación de alimentos por hábitos higiénicos deficientes.
3. La contaminación de las aguas para consumo humano.
4. La transmisión por contacto directo (ano-mano-boca).
5. Determinadas prácticas sexuales, particularmente el anilingus.
6. La transmisión posible de ooquistes desde heces de animales infectados al hombre (Llop *et al.*, 2001).

## 2.7 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

La criptosporidiosis no puede ser diagnosticada solo por los síntomas, debido a que la sintomatología es similar a la desarrollada por otras enfermedades intestinales causadas por diferentes tipos de bacterias, virus o parásitos.

Los métodos de detección e identificación para el género *Cryptosporidium* pueden agruparse en tres categorías:

### 2.7.1. MÉTODOS CLÁSICOS.

Normalmente, el diagnóstico se establece por métodos microscópicos convencionales, y se utilizan con frecuencia el método modificado de Ziehl Neelsen, Auramina Fenol en frotis fecales sin concentrar (Ocampo *et al.*, 2011),

así como también Kinyoun, dimetilsulfoxido - carbol fucsina, Safranina- Azul de Metileno, Giemsa entre otras.

### **2.7.2. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.**

Han resultado útiles dos sistemas de detección inmunológica de ooquistes de *Cryptosporidium* los cuales se basan en la detección de antígenos (Inmunofluorescencia y ELISA), cada uno de los métodos tiene un nivel similar de sensibilidad y puede emplearse tanto en muestras fecales concentradas como no concentradas.

Estos métodos inmunológicos comparados con las tinciones convencionales, los kits son costosos, considerando que aparentemente tienen un umbral similar de detección (Ocampo *et al.*, 2011).

### **2.7.3. MÉTODOS MOLECULARES.**

Como alternativa al diagnóstico convencional se han desarrollado una variedad de protocolos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ácidos nucleicos. Si bien es altamente sensible, los falsos positivos que resultan de la detección de ácidos nucleicos desnudos de microorganismos no viables o de contaminantes de laboratorio, limitan su empleo a los laboratorios de investigación. En comparación con la microscopía, cada determinación individual conlleva más tiempo y manipulación, el costo es mayor, son necesarios controles internos adecuados y deben eliminarse los inhibidores enzimáticos presentes en las muestras (Lujan & Garbosa, 2008).

### **3. HIPÓTESIS**

- Hay diferencia en la eficacia de las técnicas de tinción Ziehl Neelsen modificada, Safranina - Azul de metileno y Giemsa aplicadas para la detección de parásito *Cryptosporidium* sp. en el caracol *Lissachatina fulica* de las provincias del Guayas y Los Ríos, Ecuador.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

- Identificar la presencia del parásito *Cryptosporidium* sp. en heces de caracoles terrestres del género *Lissachatina fulica* a través de las técnicas de tinción Ziehl Neelsen modificada, Safranina - Azul de metileno y Giemsa recolectados en las provincias del Guayas y Los Ríos, Ecuador.

#### **4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Normalizar los métodos de tinción Ziehl Neelsen modificada, Safranina-Azul de metileno y Giemsa para la identificación de *Cryptosporidium* sp. en caracoles terrestres *Lissachatina fulica*.
- Evaluar la eficacia de los distintos métodos empleados.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. MATERIALES

#### 5.1.2. MATERIALES DE CAMPO

Los implementos de campo son básicos para la fácil colecta de los caracoles *Lissachatina fulica*, se requirió:

- Cámara fotográfica Digital
  - Marca : Sony Cyber - shot
  - Modelo: DSC-W320.
- Cinta de papel
- GPS o PDA HP IPAQ
  - Modelo: RX 5910
  - Serie : FA810AA#ABA
- Guantes de látex
- Herramientas de jardinería (pala y rastrillo pequeño)
- Marcadores permanentes (varios tipos).
- Recipientes plásticos rectangular con tapa, color claro
  - Capacidad : 2 L.
  - Dimensiones : L 34.5 cm, A 20.5 cm, H 11.8 cm.
- Ficha de campo
- Termohigrómetro digital
  - Marca: HYGRO-THERMOMETER
  - Modelo: L562

#### 5.1.3. MATERIALES Y EQUIPO DE LABORATORIO

Los materiales y equipos requeridos son los básicos existentes en un laboratorio de análisis biológico, los cuales incluyen:

##### **Materiales:**

- Aplicador de madera
- Bandeja de metal
- Cajas porta objetos (plásticas/madera)

- Cubreobjetos
- Registro de análisis diario
- Fósforos
- Gasas
- Guantes de látex
- Gradilla (tubos de ensayos)
- Lápiz graso
- Mechero de Alcohol
- Papel filtro
- Papel periódico
- Pinzas metálicas de disección
- Pipeta Pasteur estériles de 1 y 5 mL.
- Portaobjetos
- Recipiente plástico
- Termómetro
- Tubos cónicos Falcon de 50 ml.
- Tubos de ensayo (100 X 15 ml)
- Varilla de vidrio

**Equipos:**

- Balanza analítica:
  - Marca : Mettler Toledo
  - Modelo : AB204-S/FACT
- Centrífuga de 5000 rpm
  - Marca : CLAY ADAMS
  - Modelo: Dynac III
- Estéreo microscopio
  - Marca : Motic
  - Modelo: M7169
- Estufa:
  - Marca : Memmert
  - Modelo: BE400
- Microscopio óptico con objetivo de 100x:
  - Marca : Olympus

Modelo: BH-2

- Refrigerador y Congelador:

Marca : Durex

Modelo: TFF-21 115v 60Hz

#### **5.1.4. REACTIVOS**

Es indispensable contar con soluciones concentradas con su respectivo grado analítico, es decir, la máxima pureza posible a fin de evitar exponer al organismo a elementos traza o compuestos que puedan dar un falso positivo o negativo en la ejecución de la técnica, muchos de ellos fueron conservados en frascos herméticamente cerrados, protegidos de la luz y a baja temperatura.

- Aceite de Inmersión
- Agua Destilada Estéril
- Alcohol Ácido
- Alcohol etílico - Puro
- Azul de Metileno
- Cloruro de Sodio (ClNa<sub>2</sub>)
- Formol al 2%
- Fucsina fenicada
- Giemsa
- Lugol
- Safranina al 1%
- Solución Salina al 8.5%

#### **5.1.5. INSTALACIÓN**

Para el análisis del *Cryptosporidium* sp. se utilizaron las instalaciones del **Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI)**, que consta de áreas específicas, delimitadas físicamente y totalmente equipadas, correspondientes a las normas básicas de bioseguridad para la prevención de una contaminación cruzada en el procesamiento de las muestras y del personal que se encuentra laborando.

## 5.2. FASE UNO: MÉTODO DE CAMPO

### 5.2.1. ANTECEDENTES DEL ÁREA DE ESTUDIO.

#### 5.2.2. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El Ecuador, tiene cuatro regiones geográficas: Costa, Sierra, Amazonia y Región Insular, con dos estaciones: **Estación Lluviosa** que va desde mediados de Diciembre hasta mediados de Mayo; y, **Estación Poco Lluviosa** mediados de Mayo hasta principios de Diciembre; dividido en 24 Provincias con sus respectivos cantones.

El universo geográfico de esta investigación **no** tiene un alcance regional pero se referirá especialmente a dos provincias de la región costa: **Guayas y Los Ríos** con sus respectivos cantones, en la que abarcará diferentes tipos de localidades que corresponderán a poblaciones urbanas o rurales en la que se ha evidenciado la presencia de los caracoles Gigantes Africanos (*Lissachatina fulica*).

##### 5.2.2.1. GUAYAS

La provincia del Guayas está ubicada en la región litoral del país, al suroeste del Ecuador. Se encuentra atravesada por la Cordillera Costanera denominada *Chongón - Colonche*, que nace al oeste del Cerro Santa Ana, frente a la ciudad de Guayaquil y se prolonga hacia la provincia de Manabí. Su capital es la ciudad de Guayaquil. La provincia toma el nombre del río más grande e importante de su territorio, el río Guayas.

Tiene una extensión territorial de 18.661,69 km<sup>2</sup>, con una Altitud de 111 msnm, con coordenadas 0°58'0" S y 79°33'0" W en formato DMS (grados, minutos, segundos) o -0.966667 y -79.55 (en grados decimales). Su posición UTM es PU69 y su referencia Joint Operation Graphics es SA17- 03, temperatura promedio de 25°C con una precipitación anual de 1.500 mms. La división territorial comprende 25 cantones que derivan 50 parroquias urbanas y 29 parroquias rurales (Prefectura del Guayas, 2012; Getamap.net, 2014).

Los cantones seleccionados son: **Guayaquil, Durán y Milagro** (Fig. 5). Estos tres cantones tienen afinidad porque está demostrada una alta prevalencia de caracoles *Lissachatina fulica* infectados por *Angiostrongylus cantonensis* información proporcionada por el departamento de Laboratorio de Parasitología del INSPI, razón por la cual se tomó en consideración los cantones ya mencionados.



**Fig. 5. Mapa físico del Guayas – Modificado.**  
**FUENTE:** [http://virtualtourssouthamerica.com/ESPANOL\\_SA/ECUADOR\\_MAP\\_ES/GUAYAS/guayas.html](http://virtualtourssouthamerica.com/ESPANOL_SA/ECUADOR_MAP_ES/GUAYAS/guayas.html)

### 5.2.2.2. LOS RÍOS

La provincia de Los Ríos está ubicada en la región litoral del Ecuador, donde se encuentran las tierras más fértiles del país, por lo cual, la agricultura será siempre una de las actividades primordiales. Se dice que por la cantidad de ríos que la cruzan, García Moreno la denominó con este nombre. Los ríos nacen en la Cordillera Occidental de los Andes y el principal de ellos es el río Babahoyo cuyos dos principales afluentes en la llanura son el Caracol y el San Pablo, ambos aptos para la navegación.

Su capital es la ciudad de Babahoyo. Tiene una extensión territorial de 7.150,90 km<sup>2</sup>, con una Altitud media de 154 m.s.n.m. por lo que no superan los 500 m.s.n.m. debido a que la mayor parte del terreno es plano, sus coordenadas son 1°25'0" S y 79°34'60" W en formato DMS (grados, minutos, segundos) o -1.41667 y -79.5833 (en grados decimales). Su posición UTM es PU54 y su referencia Joint Operation Graphics es SA17-07. La división territorial comprende 13 cantones que derivan 23 parroquias urbanas y 14 parroquias rurales (Getamap.net, 2014; Gobierno Provincial de Los Ríos & SENPLADES, 2011).

La provincia cuenta con un clima tropical monzónico (se aplica al clima que tiene lluvias fuertes y abundantes) con un clima Tropical seco y con una temperatura media que oscila entre 22 y 33 °C, en la época seca es fresco y en época de lluvias es caluroso, con altas y continuas precipitaciones de 1.867 mms (González *et al.*, 2010).

Los cantones seleccionados son: **Babahoyo**, **Quevedo** y **Ventanas** (Fig. 6). La elección de estos cantones se considera de igual situación que la anterior, reflejada por las investigaciones realizadas en el INSPI en la búsqueda del nematodo *Angiostrongylus cantonensis* en los caracoles Gigantes Africanos (*Lissachatina fulica*), por la manipulación y la ingesta de estos en forma cruda, como es el caso de Ventanas donde fue el primer lugar del Ecuador y América

del Sur en ser demostrado el primer foco de infección por *A. cantonensis* en caracoles *Pomacea* y luego en *Lissachatina fulica* (Martini & et al., 2008).



**Fig. 6. Mapa físico de Los Ríos – Modificado.**  
Fuente: [http://virtualtourslatinamerica.com/ESPAÑOL\\_SA/ECUADOR/LOS\\_RIOS/los\\_rios.html](http://virtualtourslatinamerica.com/ESPAÑOL_SA/ECUADOR/LOS_RIOS/los_rios.html)

### 5.2.3. DETERMINACIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO.

Cada localidad elegida como punto de muestreo fue seleccionada mediante un recorrido por la zona, contando previamente con la autorización de los propietarios del área, explicándoles del estudio e importancia de la presencia

de los caracoles Gigantes Africanos (*Lissachatina fulica*), verificando que estén presente en el sitio seleccionado.

Se procedió a la toma de las coordenadas y otras variables físico-biológicas donde los datos fueron registrados en el formulario de campo de las localidades muestreadas en la de las dos Provincias del Ecuador (**Anexo 1, 2**) (**Tabla.2**).

#### **5.2.4. ESTIMACIÓN DE LA CANTIDAD DE MUESTRA.**

La estimación del tamaño de muestra a analizar, comprenderá todos los caracoles Gigantes Africanos (*L. fulica*) encontrados y recolectados por el método aleatorio por un lapso de 30 minutos, durante el periodo de época lluviosa 2012 - 2013.

#### **5.2.5. TRANSPORTE Y MANEJO DEL MATERIAL BIOLÓGICO**

Una vez que fueron colectados, se depositaron los caracoles *L. fulica* en un recipiente plástico portátil *ad hoc*, con pequeñas aberturas en la pared del mismo, que le servirán como conductos de aireación para crearles el menor estrés posible.

Posteriormente se los traslada al Laboratorio de Parasitología del INSPI, donde fueron analizados vivos, para proceder primero a la recolección del material fecal y el material biológico (*L. fulica*) fue entregado para diferentes análisis en el INSPI.

**Tabla 2. Registro de los factores ambientales obtenidos de las zonas muestreadas. Datos mensuales proporcionados por el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI, 2013).**

PROVINCIA	CANTON	LOCALIDAD	VARIABLES						COORDENADAS			ESPECIMENES RECOLECTADOS	CARACOLES POSITIVOS
			TEMPERATURA		HUMEDAD RELATIVA	PLUVIOSIDAD mm	TIPO DE SUELO	ECOLOGIA FAUNA ACOMPAÑANTE	LATITUD	LONGITUD	ALTURA msnm		
			Mínima	Máxima									
GUAYAS	GUAYAQUIL	MUCHO LOTE	24,1	32,2	78%	278	MATERIAL DE RELLENO	PERROS	2°09'03,7"	79°92'34,01"	18	30	30
		MIRAFLORES	24,37	32,21	81%	257	HUMICO	PERROS, ROEDORES Y AVES	2°09'51.1"	79°55'02.9"	4,19	39	39
	DURAN	EL RECREO	23,7	32,2	73%	61,2	MATERIAL DE RELLENO	PERROS, GATOS Y AVES	2°10'53.4"	79°48'54,5.6"	8,77	38	24
		PRIMAVERA 3	24,37	32,21	74%	43,9	FRANCO	PERROS, GATOS Y AVES	2°11'16.1"	79°51'21.6"	2,69	50	50
	MILAGRO	CHOBO	23	30,3	93%	292,5	HUMICO	ANIMALES DOMESTICOS, SILVESTRES Y AVES DE GRANJA	2°15'00"	79°63'53"	21,2	40	40
		PARQUE CENTRAL	23	30,3	93%	292,5	HUMICO	PERROS, GATOS, ROEDORES Y AVES	2°07'43,2"	79°35'37,7"	33	14	14
LOS RIOS	BABAHOYO	BARRIO LINDO	22,7	29,3	87%	611,9	FRANCO	ANIMALES DOMESTICOS, ROEDORES Y AVES DE GRANJA	1°48'24,6"	79°32'21,6"	29,5	25	25
		PLUEVO NUEVO	22,2	28,6	83%	4,6	FRANCO	PERROS Y SAPOS.	1°32'38,2"	79°31'46,5"	39	39	9
	VENTANAS	ZAPOTAL	22,1	28,9	91%	18,5	HUMICO	AVES Y PERROS	1°21'34,1"	79°24'56,1"	70	44	44
		LAS PALMERAS	22,3	29,5	81%	2,6	FRANCO	ROEDORES, SERPIENTES Y ANIMALES SALVAJES	1°26'22,3"	79°27'30,4"	48	25	17
	QUEVEDO	KM 1 VIA A VALENCIA (Centro)	23	31,5	78%	808,1	MATERIAL DE RELLENO	AVES Y PERROS	1°01'11,4"	79°27'18,0"	76	26	16
		LA VENUS	23,3	31,1	81%	431,8	FRANCO	AVES Y PERROS	1°2'31,5"	79°28'30,1"	74	41	21

**5.2.6. DESCRIPCIÓN DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN FASE DE CAMPO.**

<b>FACTORES</b>	<b>DETALLE</b>	<b>ANALISIS</b>	<b>ESCALA</b>
<b>TEMPERATURA</b>	La temperatura es una magnitud física que refleja la cantidad de calor o energía térmica ya sea de un cuerpo, de un objeto o del ambiente.	Cuantitativa	Se utiliza la escala de grados Celsius
<b>HUMEDAD RELATIVA</b>	El porcentaje de vapor de agua que hay en el aire por unidad de volumen bajo condiciones actuales.	Cuantitativa	100% HR
<b>PLUVIOSIDAD</b>	Es la cantidad de lluvia que recibe un sitio durante un tiempo determinado.	Cuantitativa	La medición se expresa en mililitros (ml) de agua
<b>TIPO DE SUELO</b>	La parte superficial de la corteza terrestre, biológicamente activa, que tiende a desarrollarse en la superficie de las rocas emergidas por la influencia de la intemperie y de los seres vivos (meteorización).	Cualitativo	<u>Suelos:</u> Arcillosos, Limosos, Humíferos, Calizos, Pedregoso, Francos.
<b>ECOLOGÍA (PRESENCIA DE ANIMALES)</b>	Por su interacción con los vectores (Moluscos) se puede detectar cambios importantes en el hábitat, nos advierten sobre la situación que podrían en riesgo la salud de las personas.	Cualitativo	Se apreciará animales como invertebrados y vertebrados.

### **5.3. FASE DOS: MÉTODO DE LABORATORIO.**

#### **5.3.1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO EN EL LABORATORIO.**

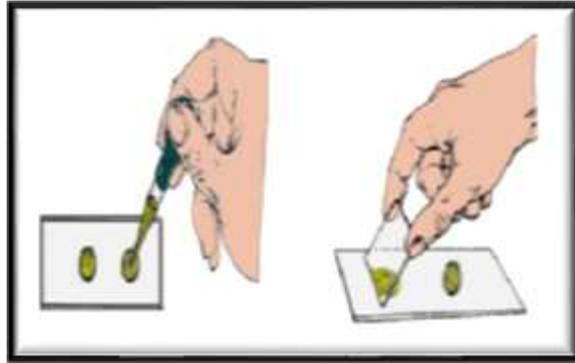
Los caracoles Gigantes Africanos (*L. fulica*), una vez recolectados en cada uno de los puntos elegidos, fueron distribuidos en grupos en los recipientes plásticos, repectivamente rotulados, previamente los organismos fueron lavados con agua destilada para sacar la suciedad del ambiente natural. Al transcurrir un determinado tiempo, se procede con la recolección del material fecal en la que se emplearon los diferentes protocolos previamente establecidos en el laboratorio de parasitología del INSPI para la detección de agentes patógenos.

#### **5.3.2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA**

##### **5.3.2.1. TÉCNICA EMPLEADA: ANÁLISIS EN FRESCO**

Se colectó el material fecal aproximadamente 2g en tubos de ensayo, diluyendo a una concentración de 1:1 con solución salina al 8.5% hasta homogenizar utilizando los aplicadores de madera. Posteriormente se filtra la muestra a través de una gasa para evitar fragmentos sólidos.

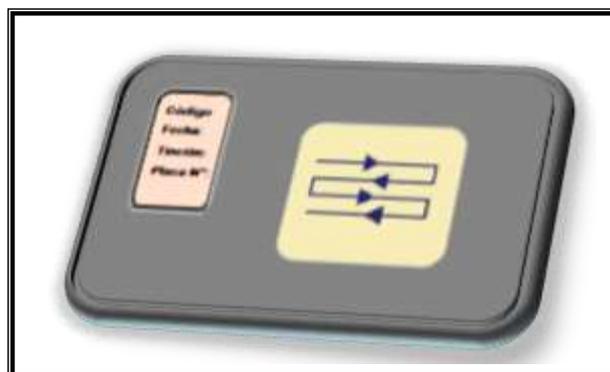
Se deposita en un portaobjeto 25  $\mu$ L de la muestra homogenizada, colocamos el cubreobjeto, procurando que el preparado sea fino y de extendido homogéneo (Fig.7), observando con objetivo de menor aumento 10X para identificar alguna estructura sospechosa, pasamos al de mayor aumento 40X, recordando recorrer todo el preparado (Fig.8). Este método es rápido y adecuado para observar diferentes formas vegetativas o parasitarias, pero resulta poco sensible cuando la carga parasitaria es baja.



**Fig.7.** Colocación y extendido de la muestra.  
**Autor:** *Biutty Cazorla Caicedo.*

Este análisis directo o en fresco, se puede mejorar con el agregado de una gota de colorante a la muestra, la más usada es la solución de Lugol, la cual puede ser agregado por capilaridad en el borde del cubreobjeto o bien colocando directamente una gota sobre el preparado.

Este tipo de análisis en fresco observado microscópicamente, nos permite visualizar al *Cryptosporidium sp.* basado en su morfología, estructura interna y su capacidad de movimiento en medios líquidos generando así ya un diagnóstico definitivo. Es por esta razón, que se requiere de una previa capacitación al investigador para este tipo de análisis ya que es un medio rápido de diagnóstico en las infecciones producidas por parásitos intestinales (Parasitología General, 2012; Val, 2012).



**Fig. 8.** Modo de observación de la muestra.  
**Autor:** *Biutty Cazorla Caicedo*

### **5.3.2.2. TÉCNICA EMPLEADA: CONCENTRACIÓN**

Si la carga parasitaria es baja, el examen directo puede dar falsos negativos. Para reducir este error se utilizó la técnica de concentración por centrifugación, que consiste precisamente en concentrar en un volumen pequeño las formas parasitarias diseminadas en la muestra, separándolas del medio que las rodea y de otros elementos que pudieran dificultar la observación.

#### **PROCEDIMIENTO:**

1. Colocar en un tubo de ensayo, la cantidad obtenida del material fecal proveniente de los recipientes *ad hoc*, llenando hasta la cuarta parte del tubo con la solución salina al 8.5%.
2. Homogenizar y filtrar con gasa, el material fecal y recoger el filtrado en otro tubo de ensayo.
3. Completar el filtrado con solución salina hasta llenar el tubo y centrifugar 5 minutos a 2500 rpm. Si el sobrenadante es muy turbio, se repite el proceso de homogenizado, filtrado y centrifugado, hasta que el sobrenadante salga lo más limpio posible.
4. Decantar el sobrenadante y agitar el sedimento.
5. Con una pipeta Pasteur tomar una alícuota del sedimento y colocarla en un porta-objeto previamente limpio y desengrasado, inmediatamente hacer un extendido en forma ovoide de aproximadamente 2 cm de largo por 1.5 cm de ancho. Quedando el preparado fino y extendido en forma homogénea. (Fig.9).
6. Dejar secar al aire el frotis y se duplicaran las muestras por cada técnica de tinción: Ziehl Neelsen modificada, Safranina-Azul de metileno y Giemsa.

Los mejores resultados se consiguen cuando las extensiones se dejan secar durante toda la noche. Los tiempos planteados en la investigación de exposición de los frotos a cada uno de los reactivos son aquellos que resultaron de la estandarización previamente realizada en el laboratorio de Parasitología, teniendo en cuenta que el material usado en especial el portaobjeto debe ser previamente desengrasado con alcohol.

### 5.3.2.3. TÉCNICA EMPLEADA: FIJACIÓN

Los métodos de tinción que se utilizaron para la detección de *Cryptosporidium* sp. son de gran utilidad, pero deben usarse siempre con precaución, ya que pueden conducir a errores. Las moléculas del colorante forman en ocasiones precipitados o agregados que parecen estructuras celulares auténticas, pero que son formaciones completamente artificiales inducidas por el mismo colorante. Tales estructuras se denominan artefactos, y se deben tomar mucha precaución para tener la seguridad en no equivocarnos al creer que un artefacto es una estructura realmente existente del parásito (Val, 2012).

Para eso utilizaremos la tinción de **Ziehl Neelsen modificada** (metodología detallada en Anexos 3) ya que es una técnica de tinción diferencial, rápida y económica, aplicada para la visualización de varios microorganismos ácido-resistentes, entre ellos, parásitos coccídeos como el *Cryptosporidium* sp., ya que se caracteriza por sus propiedades de ácido - alcohol resistente, en la cual es aplicada en todas las investigaciones dirigidas a la identificación de dicho parásito.

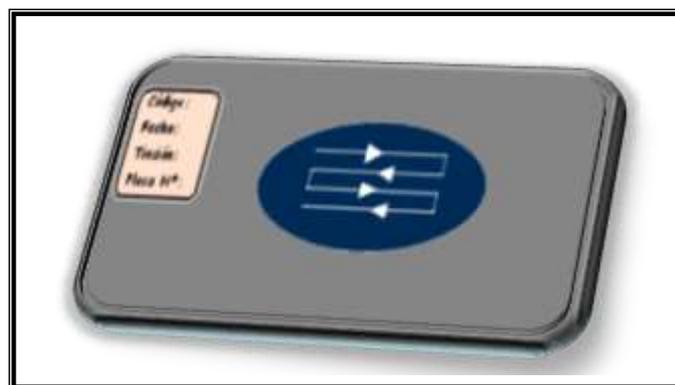
Esta tinción se fundamenta en la capacidad que tienen algunos microorganismos de resistir a la decoloración por ácido y alcohol. Esta propiedad se debe al alto contenido de lípidos complejos (ácidos micólicos) en la pared celular, por lo que requiere calentamiento para aumentar la energía cinética de las moléculas del colorante lo cual facilita la entrada a la pared celular. Al suspender el calentamiento y enfriar con agua, provoca una nueva

solidificación de los ácidos grasos de modo que el colorante ya no puede salir de la cubierta quística del parásito (Negroni, 2009 & Zamudio, 2011).

En la observación microscópica de contraste de fase de esta técnica, se ve que posee una doble pared y una estructura formada por 4 esporozoítos vermiformes y cuerpos residuales que no son claramente visibles. Puede observarse varios tipos de ooquistes: ooquistes no esporulados y ooquistes esporulados, en los cuales en muchos casos es posible observar los esporozoítos como líneas transversales claras y el cuerpo residual como una mancha oscura excéntrica cuando están teñidos con Ziehl Neelsen modificado (Flores *et. al.*, 2010).

La tinción de **Safranina - Azul de metileno** es comúnmente usado para teñir tejidos biológicos, sirve como herramienta en la detección de estructuras en células eucariontes y procariontes. Por lo que permite colorear los ooquistes de *Cryptosporidium* sp. de color rojo naranja o anaranjado brillante (Anexo 4).

La tinción de **Giemsa** es un colorante diferencial ya que emplea más de un colorante (eosina y azul metileno). Es utilizada en hematología para diferenciar los elementos sanguíneos normales y en microbiología para identificar parásitos. Se observaran los ooquistes generalmente coloreados de tono azulado o violáceo, con corpúsculos internos rojizos o purpuras más intensamente teñidos (Anexo 5).



**Fig.9.** Forma sistemática del extendido para las tinciones con objetivo de 100X.

**Autor:** *Biutty Cazorla Caicedo.*

Una vez aplicadas las tinciones en las placas, se procede al análisis microscópico de los extendidos. Tal como se demuestra en la presentación de la fig. 9, facilitando de este modo la comprensión integral de la técnica utilizada para la identificación del parásito.

### **5.3.3. PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA**

Para la preservación de cada muestra fecal se las conserva en viales de 1.5 ml con solución salina 8.5% para su congelación y otra alícuota en tubos de ensayo de 5 ml con formol al 2%, teniendo presente que cada tubo debe ser debidamente codificado.

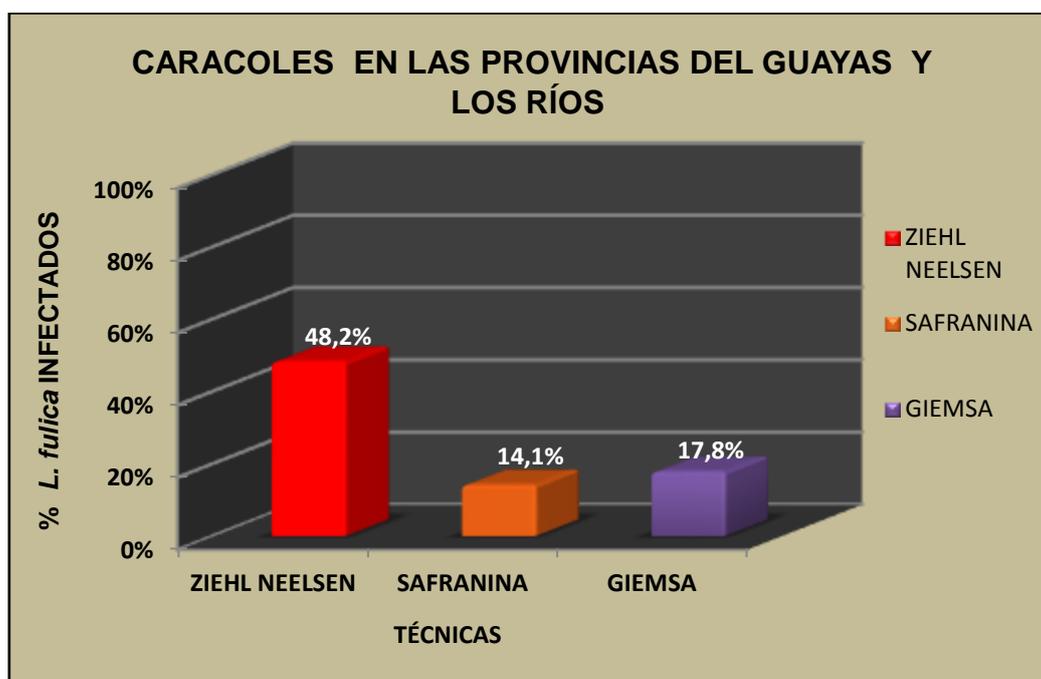
## **5.4. ANÁLISIS DE DATOS**

En el presente trabajo de investigación se procedió a realizar el análisis de datos a través de una estadística descriptiva en época lluviosa del periodo 2012 y 2013, creando una base detallada en el programa de Excel 2007 en donde se elaboran gráficos representativos de los cantones muestreados de cada provincia y la aplicación del análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, empleando la prueba de Tukey al 5% para comparar las medias de las técnicas empleadas y se utilizó el programa estadístico QED Statistics 2007.

## 6. RESULTADOS

### GRÁFICO 1.

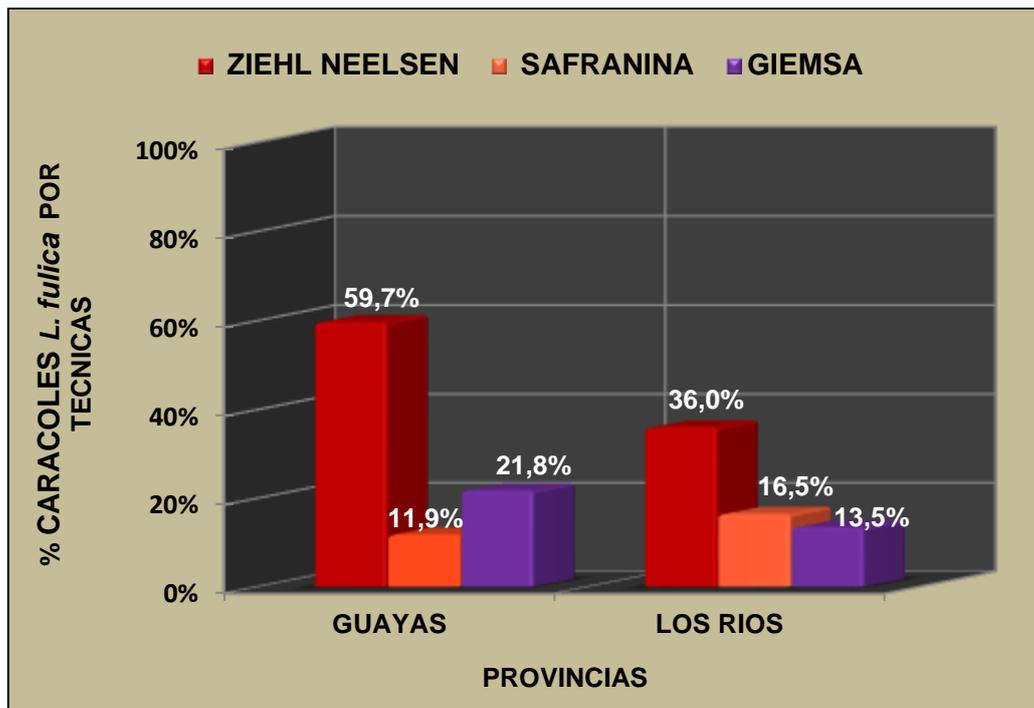
A continuación en el gráfico 1, se presenta los diferentes porcentajes de cada técnica empleada para la identificación del parásito *Cryptosporidium* sp. en los caracoles *Lissachatina fulica* en ambas provincias del Ecuador obteniéndose un alto porcentaje de positividad del 48.2% con la técnica **Ziehl Neelsen modificada**; seguida de la técnica de **Giemsa** con un 17.8% y 14.1% en la técnica de **Safranina - Azul de metileno**.



Porcentaje global en ambas provincias del Ecuador en los caracoles *Lissachatina fulica* infectados por el parásito *Cryptosporidium* sp. detectados por los tres métodos empleados.

## GRÁFICO 2.

A continuación en la grafica 2, se presenta la estratificación de los porcentajes de cada técnica empleada para la identificación del parásito *Cryptosporidium* sp. en los caracoles *Lissachatina fulica* obteniéndose un alto porcentaje de positividad del 59.7% en la Provincia del Guayas y un 36% en la Provincia de Los Ríos con la técnica **Ziehl Neelsen modificada**; seguida de la técnica de **Giemsa** con un 21.8% en la provincia del Guayas y 13.5% en la provincia de Los Ríos y para la técnica de **Safranina-Azul de metileno** un 16.5% para la Provincia de Los Ríos y 11.9% en el Guayas.

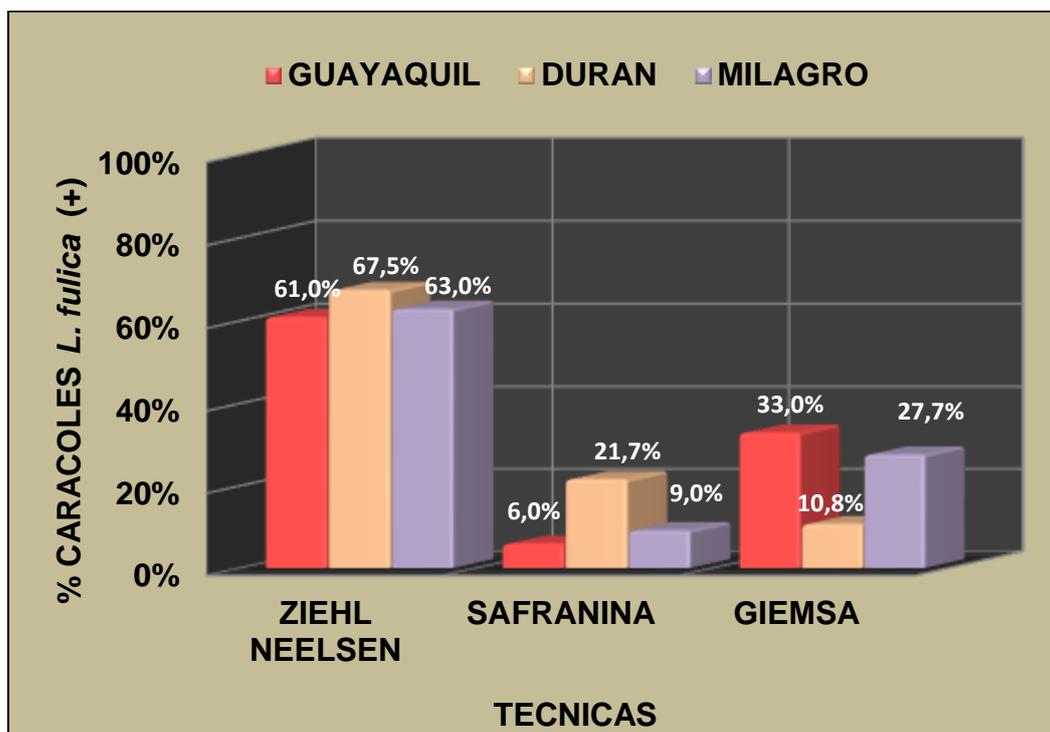


Porcentaje global de caracoles *Lissachatina fulica* infectados por el parásito *Cryptosporidium* sp. por las tres diferentes técnicas empleadas en cada provincia.

### GRÁFICO 3.

#### PROVINCIA DEL GUAYAS (2012 - 2013)

En la grafica 3, se observa un porcentaje de organismos positivos para *Cryptosporidium sp.* con un 67.5% para el cantón Durán, mientras que en Milagro presentó un 63% y en Guayaquil un 61% con la técnica **Ziehl Neelsen modificada**, a diferencia de la técnica **Giemsa** los porcentajes fueron del 33% en Guayaquil, 10.8% Durán y 27.7% en Milagro; finalmente para la técnica **Safranina – Azul de metileno** se obtuvo un 21.7% en Durán, 9% en Milagro y 6% Guayaquil.

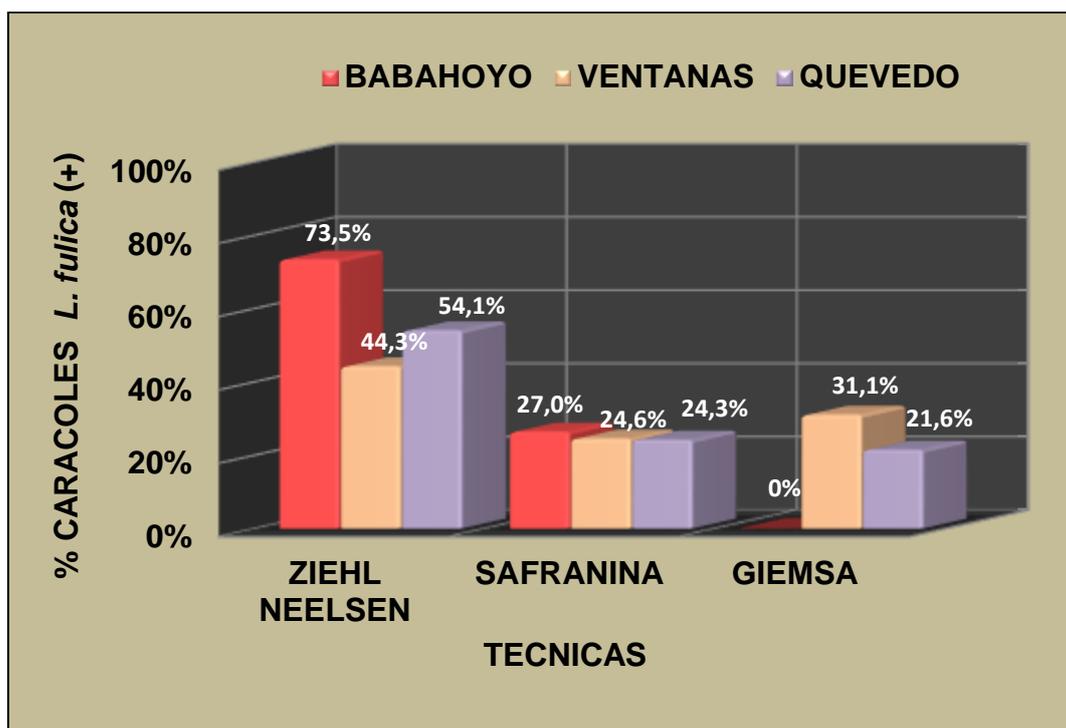


Porcentaje de caracoles *Lissachatina fulica* infectados por el parásito *Cryptosporidium sp.* por las tres diferentes técnicas en los cantones Guayaquil, Durán y Milagro.

#### GRAFICO 4.

#### PROVINCIA DE LOS RÍOS (2012 - 2013)

En la grafica 4, se observa un alto porcentaje de organismos positivos para *Cryptosporidium sp.* con un 73.5% para el cantón Babahoyo mientras que en Quevedo presento un 54.1% y en Ventanas un 44.3% con la técnica **Ziehl Neelsen modificada**, a diferencia de la técnica **Giemsa** los porcentajes fueron del 31.1% en Ventanas, 21.6% en Quevedo y 0% en Babahoyo; finalmente para la técnica **Safranina – Azul de metileno** se obtuvo un 27% en Babahoyo, 24.6% en Ventanas y 24.3% en Quevedo.



Porcentaje de caracoles *Lissachatina fulica* infectados por el parásito *Cryptosporidium sp.* por las tres diferentes técnicas en los cantones Babahoyo, Ventanas y Quevedo.

**TABLA 2.**

El análisis de varianza (**ANOVA**) con la prueba de Tukey determinó que hay una diferencia significativa entre las tres técnicas aplicadas para la identificación del *Cryptosporidium sp.* en los caracoles *Lissachatina fulica* con un ( $p < 0.05$ ) en las provincias del Guayas y Los Ríos, demostrando que la técnica **Ziehl Neelsen modificado** es tres veces más efectiva frente a la técnica **Giemsa** y **Safranina – Azul de metileno**, mientras tanto, entre la técnica **Giemsa** y **Safranina – Azul de metileno** son estadísticamente iguales.

Results: One way ANOVA						
One Way ANOVA						
	DF	SS	MS	F	Prob.>F	Omega <sup>2</sup>
Between	2	1969.44	984.722	13.2099	0.00049162	0.575669
Within	15	1118.17	74.5444			
Total	17	3087.61	18.2778			
This means	There is a significant difference in means between the treatments (F = 13.2099, DF1 = 2, DF2 = 15, P = <0.05)					
Means and Variability						
Group	Mean	Variance	StdD	N		
ZIEHL NEELSEN	33	128	11.3137	6		
SAFRANINA	9.66667	24.6667	4.96655	6		
GIEMSA	12.1667	70.9667	8.42417	6		
Total	18.2778	181.624	13.4768	18		
Homogeneity of Variance Tests						
Test	Statistic	DF1	DF2			
Hartley Fmax	5.18919	3	5			
Cochran C	0.572365	3	5			
Bartlett Chi-square	2.82216	2				
Bartlett Probability > Chi-Square	0.24388					
Tukey						
Selected Significance Level		0.05				
Samples	Difference	Statistic	Prob.	Conclusion		
ZIEHL NEELSEN vs. SAFRANINA	23.3333	6.6198	0.000843789	Means Different		
ZIEHL NEELSEN vs. GIEMSA	20.8333	5.91053	0.00222165	Means Different		
SAFRANINA vs. GIEMSA	2.5	0.709264	0.871705	Means Same		

**ANOVA - Aplicación de tres técnicas en caracoles *Lissachatina fulica* para la detección de *Cryptosporidium sp.* en las provincias del Guayas - Los Ríos (2012 - 2013).**

Según los resultados obtenidos a través del análisis de varianza (ANOVA) se acepta la hipótesis **la cual manifiesta que hay diferencia en la eficacia** de la técnica de tinción Ziehl Neelsen modificada (ZNm) aplicada en la detección del parásito *Cryptosporidium* sp. en el caracol *Lissachatina fulica* de las provincias del Guayas y Los Ríos, Ecuador. Confirmando de esta manera que la técnica Ziehl Neelsen modificada sigue siendo de mejor rendimiento como lo publican otros estudios realizados y vinculados al tema.

## 7. DISCUSIÓN

A pesar de que se contaba con antecedentes de la presencia de caracoles terrestres Gigantes Africanos (*Lissachatina fulica*) en el Ecuador como especie no endémica, altamente invasora y atribuírsele como vector epidemiológico con afectación a la salud pública, social y agrícola no se desarrollaron mayores investigaciones científicas debido al poco interés de las autoridades pertinentes como ya se mencionó anteriormente.

En Ecuador, existen varios estudios publicados acerca del caracol Gigante Africano asociado con un nematodo, el *Angiostrongylus cantonensis* el cual es causante de la meningoencefalitis eosinofílica en nuestro medio (Martini *et al.*, 2008).

Este registro helmintológico, ratifica la relación parásito - hospedador debido al contacto cercano que existe entre ellos a través del medio ambiente, estando estrechamente relacionados entre sí, produciéndose de esta forma las denominadas infecciones parasitarias (Neghme & Silva, 1971) y considerando la susceptibilidad de los caracoles de hospedar agentes patógenos en diversos estadios biológicos, principalmente en épocas lluviosas debido a que la reproducción del caracol es mayor, me permite abordar que debido a toda esta interacción de parásito - vector - factor ambiental, es previsible la identificación y por primera vez del parásito *Cryptosporidium* sp. en las heces de los caracoles terrestres Gigantes Africanos en las provincias del Guayas y de Los Ríos.

Para la identificación de la presencia de *Cryptosporidium* sp. en los caracoles Gigantes Africanos se estableció en ésta investigación, un análisis Coprológico y un modelo comparativo entre las técnicas de tinción, determinando un 59.7% de positividad para ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en la provincia del Guayas y un 36.0% en la provincia de Los Ríos con la técnica Ziehl Neelsen modificada (ZNm) que corresponde al método tradicional y usado como referencia en los laboratorios en la detección de dicho parásito.

En relación a trabajos similares realizados, encontramos que en Valparaíso, Chile, obtuvieron un 40% (4/10) de positividad bajo esta técnica, en caracoles

*Helix aspersa* (Neira, 2010), otra investigación realizada en caracoles *Lissachatina fulica* (*Achatina fulica*) en Campos dos Goytacazes, Brasil, se determinó un 52% (26/50) de positividad para ooquistes de *Cryptosporidium* sp. (Schiffler *et al.*, 2008).

En cuanto a los resultados con la tinción de Safranina - Azul de metileno, nuestra investigación nos dio un porcentaje de caracoles infectados de 11.9% en la Provincia del Guayas y un 16.5% en la Provincia de Los Ríos, no se han encontrado registros publicados con esta técnica de tinción para *Cryptosporidium* sp. en caracoles, pero si ha sido documentada en otros estudios como en pollos de engorde (*Gallus gallus domesticus*) en muestras fecales, detectándose un 33.33% (30/90) en el diagnóstico para ooquistes de *Cryptosporidium baileyi* (Cardozo *et al.*, 2008).

La técnica de Giemsa obtuvo un porcentaje del 21.8% en la Provincia del Guayas y un 13.5% en la Provincia de Los Ríos, al realizar la comparación con otros estudios no se encontraron publicaciones relacionadas con los caracoles, sin embargo, este método es empleado para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en heces de otro tipos de animales y también en humanos, como lo indica el trabajo realizado en Costa Rica que demuestra un 7.2% de positividad en muestras diarreicas de niños menores de dos años (Morales & Herrera, 1986), otro estudio obtuvo un 38% (64/168) de ooquistes *Cryptosporidium* sp. en heces de becerros nacidos, aplicando la técnica de Giemsa, realizado en Egipto (El-Rahim *et al.*, 1997).

Debido a la existencia de la variación de porcentajes de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. encontrados en ambas provincias de la costa ecuatoriana en el presente estudio, se aplicó el análisis estadístico ANOVA con la prueba de Tukey, determinando que la técnica ZNm es el método de tinción con mayor capacidad de identificación para este tipo de parásito en caracoles, confirmando los resultados de trabajos vinculados al tema.

En cuanto a los factores ambientales obtenidos en esta investigación, se observa que forman un nexo ineludible que pueden dificultar o facilitar la supervivencia del parásito y/o huésped, ya que el estudio fue posible realizarlo únicamente en la estación lluviosa en las provincias del Guayas y Los Ríos,

registrándose temperaturas que oscilaron entre una mínima de 22.1°C y una máxima de 32.2°C, humedad relativa entre 73% a 93% y pluviosidad 2.6 mm a 808.1 mm por mes (Tabla 2), condiciones que se mantuvieron constantes y que podrían ser favorables para la aparición y supervivencia de dicho parásito en los caracoles, en los meses de la estación lluviosa (Enero a Marzo).

Existen registros en que los rangos de temperatura para la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* sp. son muy amplios que varían entre 20°C a 65°C (Díaz *et al.*, 2003), bajo estas condiciones no existe dificultad alguna en estar presente en nuestro medio.

Un elemento poco considerado que puede incrementar el riesgo de contaminación en Ecuador se relaciona con la confusión que existe entre los caracoles terrestres *Lissachatina fulica* y el *Helix aspersa* especie muy apreciada en la gastronomía en ciertos sectores del país, debido a su gran valor nutricional, los cuales son recolectados en estado silvestre o provenientes de criaderos los cuales son consumidos en algunos casos con una inadecuada cocción, existiendo la posibilidad de que los caracoles se encuentren infectados y por ende transmitirse a los futuros consumidores.

La presencia de este coccidio demuestra que el caracol Gigante Africano tiene la capacidad de albergar el parásito y de actuar como vehículo de transmisión de este y otros microorganismos del medio donde habita, de allí que puede ser considerado como bioindicador de contaminación, tal como lo manifiesta Neira *et al.*, 2010.

Bajos estos resultados me permite mencionar la importancia que desempeñarían estos gasterópodos terrestres no solo por la adquisición de la enfermedad, sino también por la dispersión de este parásito a diferentes zonas urbanas y rurales, donde la presencia de seres humanos de diferentes edades puedan adquirirlo, también quedaría demostrado que estaría participando dentro de la cadena epidemiológica de la criptosporidiosis al actuar como potenciales transmisores de la infección, tal como lo demuestra un trabajo similar realizado en *Achatina fúllica* actualmente llamado *Lissachatina fulica* hospedero de la especie de *Cryptosporidium* sp. en Brasil (Schiffler *et al.*, 2008).

Es de vital importancia mencionar que a pesar de la inexistente información relacionada con este parásito y hospedador en nuestro país, se logró encontrar el método más adecuado y de mejor rendimiento para la detección del parásito *Cryptosporidium* sp. en caracoles terrestres, como es la técnica Ziehl Neelsen modificada, la cual es de bajo costo, sin embargo es recomendable recurrir a un método de diagnóstico de mayor rendimiento como es el caso del análisis molecular.

A través de este estudio se evidencia la participación del caracol *Lissachatina fulica* como factor importante dentro del sistema ecológico de las parasitosis humana y animal.

## 8. CONCLUSIONES

1. Se demostró la presencia de *Cryptosporidium* sp. en los caracoles *Lissachatina fulica* constituyéndose como reservorio natural de este parásito y por ende actúa como bioindicador de contaminación ambiental, con interés clínico para el hombre.
2. Se estandarizó y aplicó tinciones diferentes como Safranina - Azul de metileno y Giemsa con el fin de observar los ooquistes de *Cryptosporidium* sp., a pesar de que hubo diferencias con el método convencional, se las pueden considerar como técnicas alternativas.
3. El *Cryptosporidium* sp. se encuentra permanentemente interactuando con el medio ambiente y hospederos, su aparición y diseminación estarían relacionadas con la época lluviosa del país.

## 9. RECOMENDACIONES.

1. Al tratarse de ser el primer estudio realizado en caracoles terrestres *Lissachatina fulica* en el Ecuador con la identificación del parásito *Cryptosporidium sp.* se recomienda estudios futuros ya sea empleando tinciones u otro métodos, como los moleculares, para la confirmación e identificación de las especies existente en el medio.
2. Promover estudios de *Cryptosporidium sp.* no solo en animales sino también en seres humanos, especialmente en quienes padezcan alteraciones del sistema inmune, y que presentan mayor susceptibilidad a la infección por estos parásitos.
3. Recordar que solo la conciencia ciudadana sobre la importancia de impedir la comercialización del caracol Gigante Africano introducido, ayudará a tener éxito, no solo en la conservación de la flora y fauna nativa, sino también evitando el peligro de contraer varias enfermedades como la criptosporidiosis.
4. Prevenir la manipulación de este caracol para evitar probables contagios, especialmente en niños y promover a través de campañas de educación para la salud la constante higiene de alimentos de origen vegetal como plantas de tallo corto, frutas que provengan de huertos y jardines en las zonas urbanas y rurales.
5. Se recomienda a las instituciones competentes difundir los peligros de esta enfermedad, evitando así la aparición de epidemias con penosos resultados.

## 10. GLOSARIO DE TÉRMINOS TÉCNICOS (\*)

**CUERPO RESIDUAL:** Es el resultado de la célula madre que rodea e individualización a las células hijas dejando un cuerpo pequeño residuo anucleado del citoplasma de la célula madre.

**EMERGENTE:** Se define como nuevas infecciones resultando de la evolución o modificación de un agente patógeno o parásito existente, que cambia de espectro de hospedadores, vector, patogenicidad o cepa / es aquella cuya incidencia en humanos ha aumentado en las últimas dos décadas (OPS).

**ENTEROCITO:** Son células epiteliales del intestino encargadas de absorber diversa moléculas alimenticias y transportarlas al interior del organismo. Se encuentra en el intestino del delgado, grueso y colon.

**ESPOROGONIA:** Proceso de división múltiple de una célula cigoto que da origen a los esporozoítos.

**ESPOROZOÍTOS:** Un esporozoíto es una etapa del ciclo de vida de un parásito protozoario durante la cual puede infectar a nuevos huéspedes.

**ESQUIZONTE:** Elemento resultante del ciclo esquizogónico.

**ESTADO EXÓGENO:** Que se forma o nace en el exterior del organismo.

**INMUNOCOMPETENTE:** Se dice que una persona es inmunocompetente cuando todas sus funciones de defensa están presentes en cantidad y calidad normal y suficiente, capaz de producir una respuesta inmunitaria normal.

**INMUNODEPRIMIDO:** Es un estado, que padecen algunas personas, que se caracteriza por una disminución o ausencia de respuesta del sistema inmunitario. Este estado puede ser causado como consecuencia de una intervención quirúrgica, tratamientos médicos como la quimioterapia o

enfermedades como el SIDA. Con la edad, el sistema inmunitario también disminuye su efectividad. Este estado les hace ser más vulnerables a enfermedades, entre ellas también las enfermedades transmitidas por alimentos.

**MEROGONIA:** Proceso de división múltiple de una forma vegetativa del parásito dando origen a un número de veces de células hijas llamadas merozoítos o esquizoítos.

**MONOXENO:** Organismo capaz de completar todo su ciclo en un solo hospedador.

**OOQUISTE:** Forma quística que contiene el cigoto resultante de la esporogonia en los Apicomplexa y los cuales pueden estar cubiertos por una envoltura translúcida (Isospora) o estar desnudos (Plasmodium).

**PROTOZOO:** Animal unicelular.

**QUISTE:** Forma inmóvil de resistencia y de multiplicación, envuelta por una doble membrana formada por los protozoos.

**REEMERGENTE:** Se define como la reaparición de una enfermedad conocida, después de una disminución significativa de su incidencia (OPS).

**ZONOSIS:** Infección que se transmite en forma natural entre el hombre y animales vertebrados y viceversa.

(\*) La elaboración del Glosario ha sido obtenida de diversas fuentes tales como diccionarios de términos generales, veterinarios, publicaciones oficiales, artículos científicos y fundamentalmente libros de parasitología sobre la investigación a tratar.

## 11. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Acha, P. & Szyfres, B. 1989. Zoonosis parasitaria. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Segunda Edición OPS/ OMS, Washington - USA. Publicación científica OPS N° 503. Pg. 585-588.
2. Aguilar, G. 2007. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp., en sistemas de producción de ganadería de carne de la zona centro de Veracruz, México. Universidad de Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Pg. 1-10. Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/handle/12345678/164>
3. Arias, G., Marina, M., Cornejo, L., Bermúdez, V. & Ramírez, O. 2008. Estudio de infección sistémica por *Herpesvirus* complicada con *Cryptosporidium* spp., en un delfín manchado del atlántico (*Stenella frontalis*. Cuvier, 1829). Venezuela. Rev. Cient. (Maracaibo) 18(3): 243-252.
4. Bentancourt, W. & Querales, L. 2008. Parásitos protozoarios entéricos en ambientes acuáticos: Métodos de concentración y detección. Venezuela. (INCI) Interciencia. 33(6): 418-423.
5. Cardozo, S., Teixeira, W., & Lopes, C. (2008). Avaliação das técnicas de rotina no diagnóstico de oocistos de. Rev. Bras. Parasitol. Vet, 17(Supl 1), 351-353.
6. Chacón, J. 2012. Protozoarios intestinales: Coccidios intestinales. Consultado el 5 Nov. 2012. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/88647758/Modulo-3>
7. Chicaiza, S. 2005. Estudio de las enfermedades protozoaricas gastrointestinales en bovinos pertenecientes a las comunidades del

proyecto MICUNI. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Pecuarias. Riobamba – Ecuador. Pg. 34-46. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1869/1/17T0697.pdf>

8. Correoso, M. 2006. Estrategias preliminar para evaluar y erradicar *Achatina fulica* (Gastropoda: Achatinidae) en Ecuador. Boletín Técnico IASA, Serie Zoológica 2: 45-52.
9. De La Parte M., Bruzual, E., Brito, A. & Hurtado, M. 2005. *Cryptosporidium spp. y Criptosporidiosis*. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. Caracas - Venezuela. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 25(1): 6 - 14.
10. Del Coco, V. & Basualdo, J. 2008. Capítulo 35 *Cryptosporidium*: Un Parásito Emergente. Red De Helmintología Para América Latina y El Caribe. Editado por Asociación Argentina de Zoonosis Buenos Aries. Consultado el 10 de Octubre 2012. Disponible en: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=bad.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=025462>
11. Díaz, O., Calvo. B. & Calchi M. 1996. Prevalencia de Criptosporidiosis en niños menores de 6 años y su relación con los factores de riesgo. Maracaibo – Venezuela. Kasmera 24 (2): 93-116.
12. Díaz, M., Leyva, E., Mata, V. & González, H. 2003. Incidencia y viabilidad de *Cryptosporidium parvum* en el agua potable de ciudad Obregón, Sonora, México. Rev.Int. Contam. Ambient. 19(2): 67-72.
13. Elika. 2004. *Cryptosporidium parvum*. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. Disponible en: [http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo19/Cryptosporidium\\_cast.pdf](http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo19/Cryptosporidium_cast.pdf)
14. El-Rahim, I.H.A.A., Borghese, A., Failla, S., & Barile, V. L. (1997). Bovine cryptosporidiosis in newborn buffalo calves. In Proceedings 5th World

Buffalo Congress, Royal Palace, Caserta, Italy, 13-16 October. Pg. 582-587. Disponible en:

<http://www.cabdirect.org/abstracts/20013057452.html;jsessionid=F211A432C98B2472EABFCC30F3DD6240>

15. Flores, J., Olivas, E., Olivas, J., Corral, B., Roncha, Y. & Gómez, J. 2010. Detección de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en suelos irrigados con aguas residuales. Agricultura Orgánica, 3ª. Edición, Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Pg. 13-17.
16. Gállego, J. 2006. Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Universitat de Barcelona - España. 517: 173-175. Disponible en: [http://books.google.com.ec/books/about/Manual\\_de\\_parasitolog%C3%ADa.html?id=XH4yn\\_OANn4C&redir\\_esc=y](http://books.google.com.ec/books/about/Manual_de_parasitolog%C3%ADa.html?id=XH4yn_OANn4C&redir_esc=y)
17. García, A., Gutiérrez, C., García, C., García, P. & Casanova, P. 2004. Brotes epidémicos de Criptosporidiosis. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz -España. Pg. 1-10.
18. Getamap.net. 2014. América del sur. Ecuador. Guayas. Los Ríos. Disponible en: <http://es.getamap.net/mapas/ecuador/quayas/quayas/>
19. Getamap.net. 2014. América del sur. Ecuador. Los Ríos. Disponible en: [http://es.getamap.net/mapas/ecuador/los\\_rios/losrios\\_provinciade/](http://es.getamap.net/mapas/ecuador/los_rios/losrios_provinciade/)
20. Gobierno Provincial de los Ríos & SEMPLADES (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo) Zona 5. 2011. Prioridades para el desarrollo integral de la provincia de Los Ríos Ecuador. ART (Articulación de Redes Territoriales). Edición Soluciones Graficas Dávila & Gómez. Pg. 1-16. Disponible en: [http://www.losrios.gob.ec/documentos/PRIORIDADES\\_DESARROLLO\\_LOS\\_RIOS.pdf](http://www.losrios.gob.ec/documentos/PRIORIDADES_DESARROLLO_LOS_RIOS.pdf)

21. González B., Cervantes X., Torres E., Sánchez C. & Simba L. 2010. Caracterización del cultivo de Balsa (*Ochroma pyramidale*) en la Provincia de Los Ríos – Ecuador. Revista Ciencia y Tecnología. 3(2): 7-11.
22. Godoy, O. 2011. Prevalencia de *Cryptosporidium spp.* e identificación de factores de riesgo en becerras de Veracruz y la comarca Lagunera. México. Universidad de Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Pg. 1-78. Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/28473>
23. Hurtado, M., Bruzual, E., Arcay, L., De la Parte, M. & Brito, A. 2010. Criptosporidiosis experimental en ratones albinos. Universidad central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay - Estado de Aragua. Rev. Fac. Cienc. Vet. 51(2): 1-11.
24. INAMHI. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. 2013. Disponible en: <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/>
25. Jacobsen K., Ribeiro P., Quist B, Rydbeck B. 2007. Prevalence of intestinal parasites in young Quichua children in the highlands of rural Ecuador. Journal Health Population and Nutrition. 25: 399-405.
26. Llop, A., Valdes-Dapena. M. & Zuazo., J. 2001. *Microbiología y Parasitología Médicas. Capítulo 91: Cryptosporidium*. Tomo III. Sección VI Parásitos. Editorial de Ciencias Medicas. La Habana - Cuba. Pág. 177-189. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/200929447/Microbiologia-y-Parasitologia-Medicas-Tomo-III>
27. Lujan, N. & Garbossa, G. 2008. *Cryptosporidium: Cien años después*. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales La Plata - Prov. de Buenos Aires - Republica Argentina. Acta Bioquímica Clín. Latinoam. 42(2): 195-201.
28. Martínez, C. 1999. *Cryptosporidium*. Dirección General de Prevención y Protección de la Salud. Madrid - España. Semergen 25(2): 116-118.

29. Martini, L., Gómez, E., Muzzio, J. & Solórzano, L. 2008. Primer registro de ratas infectadas con *Angiostrongylus cantonensis*. Descripción del primer foco de transmisión natural en Ecuador. Disponible en: <http://laboratoriodeparasitologia.blogspot.com/2012/02/primer-registro-de-ratas-infectadas-con.html>
30. Martini, L., Muzzio, J., & Solórzano, L. 2009. Morfología y Ciclo Evolutivo del *Angiostrongylus cantonensis* en *Achatina fulica*. Concurso Científico, Anual Interno INHMT-LIP Ecuador. Disponible en: [www.inh.gov.ec](http://www.inh.gov.ec). Consultado en Marzo del 2012.
31. Medina, C., Moncada, E., González, A., Rueda, M. & Rojas, G. 2012. Detección de ooquistes de *Cryptosporidium spp.* En la planta de tratamiento de aguas residuales “Taiguaiguay” del Estado Aragua, Venezuela año 2011. Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol. 71(1): 83-89.
32. MSP del Ecuador. 2012. El *Achatina fulica* ingresa a Ecuador. Instituto Nacional de Investigación y Salud Pública. Guayaquil - Ecuador. Reporte Epidemiológico Número 6.
33. Morales, M., Herrera, M. 1986. Experiencia con la tinción rápida para el diagnóstico de la diarrea por *Campylobacter sp.* y *Cryptosporidium sp.* Rev. Cost. Cienc. Med. 7(3): 297-298.
34. Navarro, L., Del Águila, C., Bornay, F. 2011. *Cryptosporidium*: un género en revisión. Situación en España. Enferm Infecc Microbiol Clin. 29(2): 135-143.
35. Neghme, A. & Silva, R. 1971. Ecología del parasitismo en el hombre. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP). 70(4): 313-29.
36. Negroni, M. 2009. *Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica*. 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires - Argentina. Disponible en:

[http://books.google.com.ec/books/about/Microbiolog%C3%ADa\\_Estomatol%C3%B3gica.html?id=Gxmui-vjZBgC&redir\\_esc=y](http://books.google.com.ec/books/about/Microbiolog%C3%ADa_Estomatol%C3%B3gica.html?id=Gxmui-vjZBgC&redir_esc=y)

37. Neira, P., Muñoz, N. & Rosales, M. 2010a. Infección por *Cryptosporidium parvum* en una mujer embarazada, inmunocompetente, con riesgo ocupacional. Universidad de Valparaíso. Santiago - Chile. Rev. Chil. Infect. 27(4): 345-349.
38. Neira, P., Muñoz, N., Stanley, B., Gosh, M., Rosales, M. 2010b. *Cryptosporidium parvum* en gasterópodos silvestres como bioindicadores de contaminación fecal ecosistema terrestres. Universidad de Valparaíso. Santiago - Chile. Rev. Chil. infect. 27(3): 211-218.
39. Ocampo, R., Cardozo, L., López, G., Álvarez, M., Pérez, J. & Rivera., F. 2011. Evaluación de métodos moleculares y microscópicos para la detección de *Cryptosporidium spp.* (Apicomplexa - Cryptosporidiidae). Universidad de Caldas, Manizales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Facultad de Ciencias para la Salud. Caldas - Colombia. Biosalud 10(1): 19-29.
40. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2004. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas): Criptosporidiosis. Quinta Edición. Pág. 1161-1170. Disponible: <http://www.oie.int/doc/ged/D6509.PDF>
41. Olmedo, J., Montoya, G., Quiroga, C. & Freire, E. 2011. Ministerio de Ambiente. Lista preliminar de especies exóticas introducidas e invasoras en el Ecuador continental. Quito - Ecuador. Disponible en: [http://chmecuador.ambiente.gob.ec/userfiles/7592/11-04-2012texto\\_\(3\).pdf](http://chmecuador.ambiente.gob.ec/userfiles/7592/11-04-2012texto_(3).pdf)
42. Prefectura del Guayas. 2012 - 2021. Plan de Ordenamiento Territorial de la Provincia del Guayas. Gobierno Provincial del Guayas. Versión 004.

Disponible en: <http://www.guayas.gob.ec/dmdocuments/ley-de-transparencia/literal-k/Plan-de-Ordenamiento-T-2013.pdf>  
<http://www.guayas.gob.ec/dmdocuments/ley-de-transparencia/literal-k/Plan-de-Ordenamiento-T-2013.pdf>

43. Parasitología general. Técnicas de diagnóstico de enteroparasitosis. 2012  
Pág.1-16. Disponible en:  
[http://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/parasitologia\\_general/pdf/TP3.pdf](http://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/parasitologia_general/pdf/TP3.pdf)
44. Rojo, F. 2009. Criptosporidiosis. Una enfermedad emergente de actualidad en España. Instituto Tomas Pascual Sanz para la Nutrición y la Salud. Madrid - España. Consultado el 12 Noviembre 2012. Disponible en:  
[http://www.institutotomaspascualsanz.com/descargas/formacion/publi/Libro\\_Enfermedades\\_Emergentes.pdf](http://www.institutotomaspascualsanz.com/descargas/formacion/publi/Libro_Enfermedades_Emergentes.pdf)
45. Sanz, B. 2010. *Cryptosporidium* y *Toxoplasma*. Dos importantes protozoos parásitos transmisibles por los alimentos y el agua. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid – España. Pág. 219-248.
46. Sarmiento, N., González, A., Santa A., Comolli, J., González, J., Roux, J. & Cayo, D. 2004. Detección de *Cryptosporidium parvum* en carpincho (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) en cautiverio, de la provincia del Chaco, Argentina. Jornadas de comunicaciones científicas y tecnológicas. 2004 - UNNE.V 050. Pg. 1-2.
47. Schiffler, C., Gomes, F., Ederli, N. & Oliveira, F. 2008. *Achatina fulica* Bowdich (1822) um novo hospedeiro de espécies de *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae). Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 17 (1): 273-276. Disponible en:  
<http://es.scribd.com/doc/16676776/Diagnostico-de-cryptosporidium-em-caramujo-africano#full%20screen>

48. Tananta, I. 2004. Presencia de enteroparásitos en lechuga (*Lactuca sativa*) en establecimientos de consumo público de alimentos en el Cercado de Lima. Rev. Inv. Vet. Perú 15(2): 157-162.
49. Val, D. 2012. Microscopía. Examen microscópico en fresco. Disponible en: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm>
50. Venturini, L., Bacigalupe, D., Basso, W., Unzaga, J., Venturini, M. & Moré, G. 2006. *Cryptosporidium parvum* en animales domésticos y en monos de un zoológico. Universidad de la Plata. Argentina. Parasitol. Latinoam. 69: 90-93.
51. Vergara, C. & Quílez, J. 2004. Criptosporidiosis: Una zoonosis parasitaria. Colombia. Revista MVZ Córdoba 9 (1): 363 - 372.
52. Zamudio, D. (2011). Técnica de tinción. Disponible en: <http://biologia-diana.blogspot.com/>

## 12. ANEXOS

### ANEXO 1.

#### FICHA DE CAMPO PARA LA DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS/ BIOLÓGICOS EN LA RECOLECCIÓN DE *Lissachatina fulica*

FECHA RECOLECCIÓN	<input type="text"/>	MUESTREO Nº	<input type="text"/>				
	<i>HORA :</i>						
PROVINCIA:	<input type="text"/>	ZONA:	<table border="1"><tr><td>URBANO</td><td><input type="checkbox"/></td></tr><tr><td>RURAL</td><td><input type="checkbox"/></td></tr></table>	URBANO	<input type="checkbox"/>	RURAL	<input type="checkbox"/>
URBANO	<input type="checkbox"/>						
RURAL	<input type="checkbox"/>						
CANTÓN/LOCALIDAD:	<input type="text"/> <input type="text"/>						
Nº CARACOLES RECOLECTADOS:	VIVOS <input type="text"/>	MUERTOS	<input type="text"/>				
CORDENADAS - GPS	<input type="text"/>						
TEMPERATURA:	<input type="text"/> °C	PLUVIOSIDAD:	<input type="text"/> ML				
HUMEDAD RELATIVA:	<input type="text"/> % HR						
CONDICIÓN AMBIENTAL:	Fauna Acompañante: _____ Clima: _____						
SUELO:	Tipo de Sustrato: _____ _____						
ACTIVIDADES ALREDEDOR DEL SITIO:	Viviendas: ____ Solar vacío: ____ Cancha deporte: ____ Parque: ____ Plantación: ____ Basura: ____ Otros: _____						
DESCRIPCIÓN DEL LUGAR:	<input type="text"/> <input type="text"/>						
OBSERVACIÓN:	<hr/>						

## ANEXO 2.

### FICHA DEL MANEJO DE LOS CARACOLES *Lissachatina fulica* PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Cryptosporidium* sp. EN EL LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA DEL INSPI

MUESTREO Nº		FECHA DE RECOLECCIÓN:					
		<i>HORA:</i>					
PROVINCIA:		ZONA:	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%; padding: 2px;">URBANA</td> <td style="width: 20%; border: 1px solid black; height: 15px;"></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">RURAL</td> <td style="border: 1px solid black; height: 15px;"></td> </tr> </table>	URBANA		RURAL	
URBANA							
RURAL							
CANTÓN/ LOCALIDAD:	<hr style="border: 0; border-top: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"/> <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>						
CARACOLES RECOLECTADOS Nº		VIVOS:					
		MUERTOS:					
TOTAL RECIPIENTES Nº		FECHA DE DISTRIBUCIÓN:					

Nº CARACOLES DISTRIBUIDOS EN RECIPIENTES:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

OTROS ESPECIMENES (MUESTRA FRESCA):

GRUPO	TIPO DE ESPECIE	Nº ESPECÍMENES EN %
<i>PROTOZOOS</i>		
<i>HELMINTOS</i>		

OBSERVACIÓN:

---



---

## ANEXO 3.

### PROTOCOLO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Cryptosporidium* sp. EN HECES DE CARACOL *Lissachatina fulica*.

#### TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN MODIFICADA

##### PROCEDIMIENTO:

1. La muestra de materia fecal se extiende 1,5 cm de diámetro.
2. Dejar secar.
3. Colocar un trozo de papel filtro y colorear con carbol-fucsina concentrada por 2 minutos, flamear hasta que haya emanación de vapor.
4. Lavar con agua de grifo.
5. Agregar Alcohol- Ácido por 1 minuto hasta decolorar
6. Lavar con agua del grifo.
7. Agregar el colorante de contraste Azul de Metileno, dejar 2 minutos. Este colorante puede remplazarse por Verde de Malaquita al 5%.
8. Lavar con agua del grifo.
9. Dejar secar a temperatura ambiente, colocándolo en posición vertical.
10. Observar el frotis seco con objetivo 100X.

##### Observar:

- Los ooquistes se teñirán de rojo brillante intenso o rojo pálido sobre un fondo azul o verde dependiendo del colorante de contraste de fase. Los ooquistes se evidenciarán de forma redondeada u ovalada de 4 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro en algunos de ellos se lograrán observar corpúsculos internos que son los esporozoitos.

## ANEXO 4.

### PROTOCOLO PARA LA IDENTIFICACION DE *Cryptosporidium* sp. EN HECES DE CARACOL *Lissachatina fulica*.

#### TINCIÓN DE SAFRANINA – AZUL DE METILENO

##### PROCEDIMIENTO:

1. Preparar un frotis delgado y secar el frotis al aire.
2. Pasar el frotis brevemente a la flama del mechero.
3. Fijar el frotis con HCL al 3% en alcohol metílico durante 3 minutos.
4. Lavar el frotis con agua del grifo.
5. Teñir el frotis con solución de Safranina al 1% caliente durante 1 minuto.
6. Lavar el frotis con agua del grifo.
7. Contrateñir con Azul de Metileno por 1 o 2 minutos.
8. Lavar el frotis con agua de la llave.
9. Dejar secar el frotis, colocándolo en posición vertical.
10. Examinar el frotis seco al microscopio utilizando objetivo de 100X.

##### Observar:

- Los ooquistes se teñirán de rojo naranja sobre un fondo gris - azul dependiendo del colorante de contraste de fase. Los ooquistes se evidenciarán de forma redondeada u ovalada de 4 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro en algunos de ellos se lograrán observar corpúsculos internos que son los esporozoitos.

## ANEXO 5.

### PROTOCOLO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Cryptosporidium* sp. EN HECES DE CARACOL *Lissachatina fulica*

#### TINCIÓN DE GIEMSA

##### PROCEDIMIENTO:

1. Realizar un frotis delgado y dejar secar al aire.
2. Fijar el frotis por 3 minutos con Metanol Absoluto.
3. Se procede a la tinción preparando una solución al 10% del colorante comercial Giemsa con agua destilada.
4. Sumergir o agregar las placas en la solución preparada por 10 a 20 minutos aproximadamente.
5. Enjuagar con agua del grifo.
6. Dejar secar al aire en posición vertical
7. Observar bajo objetivo de inmersión.

##### Observar:

- Los ooquistes se teñirán débilmente de tono azulado o violáceo, sin colorante de contraste de fase. Los ooquistes se evidenciarán de forma redondeada u ovalada de 4 a 6  $\mu$ m de diámetro en algunos de ellos se lograrán observar corpúsculos internos que son los esporozoitos de color rojizos o púrpura más intensamente teñidos.

## ANEXO 6.

### FASE UNO: CAMPO

RECONOCIMIENTO DE LAS ÁREAS AFECTADAS POR LA PRESENCIA DE LOS CARACOLES *Lissachatina fulica* EN LOS DIFERENTES CANTONES.



a), b), c) Cantones de la Provincia del Guayas; d), e), f) Cantones de la Provincia de Los Rios.

**ANEXO 6.1.**  
**TOMA DE DATOS**



**a)** Toma de temperatura con el termohigrómetro, **b)** Reconocimiento de las coordenadas con GPS, **c)** Recolecta de muestras del suelo.

**ANEXO 6.2.**  
**COLABORACIÓN DE LOS MORADORES DE LOS SECTORES**  
**MUESTREADOS**



**a)** Persona adulta ayudando en la búsqueda de los caracoles Gigantes Africanos, **b) y c)** Recolecta de los caracoles en el lugar de muestreo con la colaboración de menores de edad.

**ANEXO 6.3.**  
**PRESENCIA DE ANIMALES**



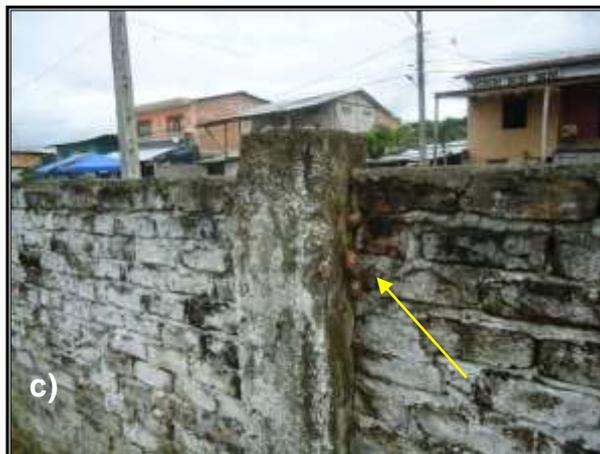
**a), b)** Ave de granja y animales domesticos conviviendo en contacto directo con los caracoles Gigantes Africanos; **c)** Un perro con su amo junto a los caracoles en un día de descanso en el parque de Durán.

**ANEXO 6.4.**  
**PEQUEÑOS CULTIVOS**



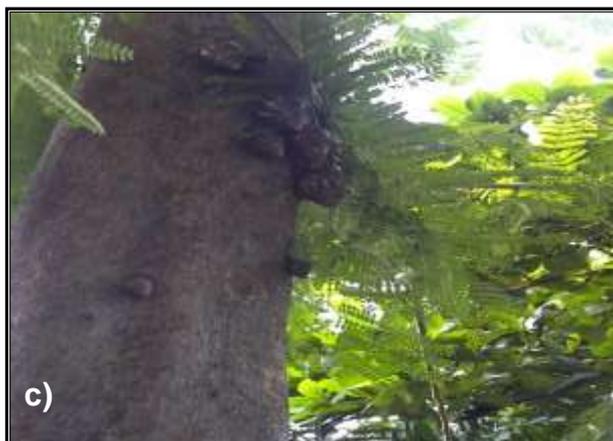
**a), b)** Presencia de los caracoles Gigantes Africanos en el entorno del cultivo de Sandía y papaya **c)** Ciruela China en contacto con las heces de los caracoles Gigantes Africanos.

**ANEXO 6.5.**  
**CONVIVENCIA CON LAS PERSONAS**



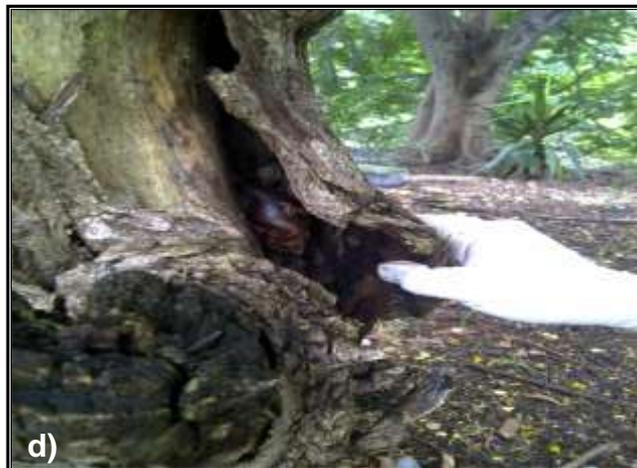
**a)** Caracoles Gigantes Africanos en las paredes de las viviendas, **b)** En el interior de jardines y, **c)** En los cerramientos de viviendas .

**ANEXO 6.6.**  
**ADAPTACION DEL COMPORTAMIENTO**



Caracoles en busca de ambiente favorable con alto grado de higroscopicidad para su desarrollo y supervivencia encontrándolos: **a)** Debajo de las hojas, **b)** Bajo materiales húmedos, **c)** Sobre árboles con fuste frondoso.

**ANEXO 6.7.**  
**ADAPTACION DEL COMPORTAMIENTO**



**c)** debajo de tablas **d)** corteza de arboles **e)** cañas, refugios naturales basandose a las condiciones de entorno al a la pérdida de agua del ambiente disminuye al máximo los periodos de letargo.

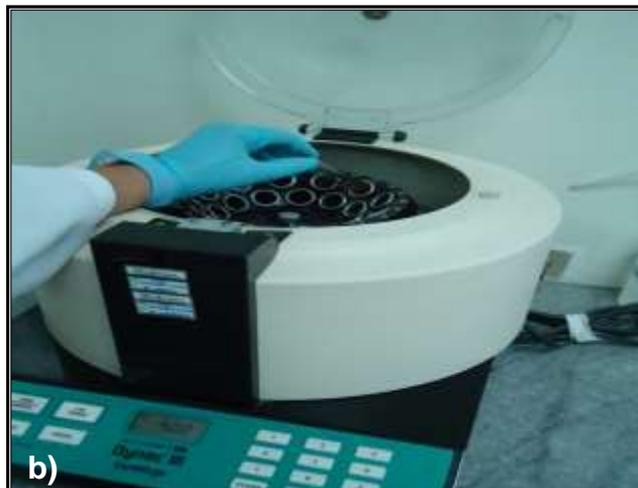
**ANEXO 7.**  
**FASE DOS: LABORATORIO**  
**PROCESO BÁSICO PARA LAS TINCIONES**



**a)** Proceso de distribución de los especímenes, **b)** Recolección del material fecal y **c)** Homogenización del material fecal con Solución Salina 8.5%.

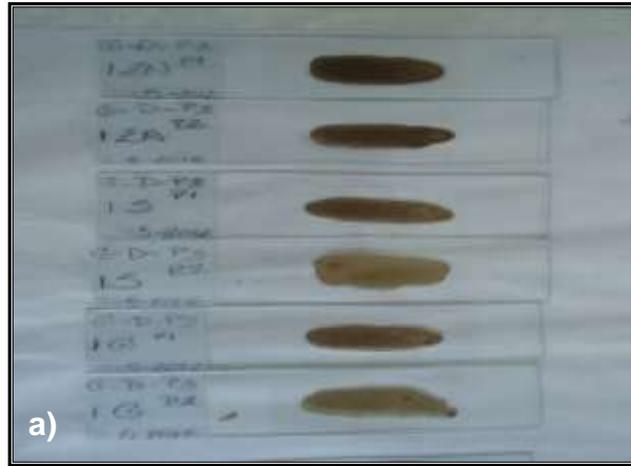
## ANEXO 7.1.

### PROCESO BÁSICO PARA LAS TINCIONES



**a)** Muestras homogenizadas, **b)** Proceso de centrifugación a 2500 o 3000 rpm de las heces de caracoles y **c)** Sedimentación de las partículas sólidas del material fecal en dos fases claramente distintas, sólida y líquida formadas en el tubo de ensayo durante la centrifugación.

**ANEXO 7.2.**  
**PROCESO BÁSICO PARA LAS TINCIONES**



**a)** Colocación de l sedimento en los porta objetos rotulados , **b)** Aplicación de reactivos para las tinciones y **c)** Flameado de las placas .

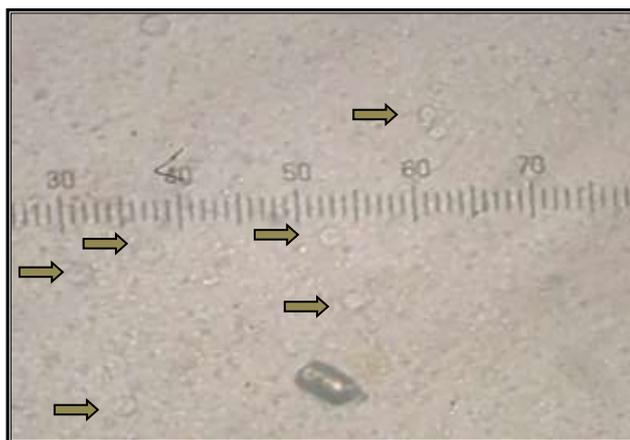
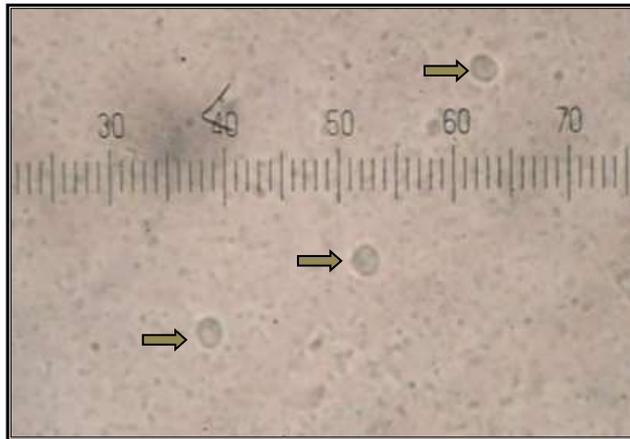
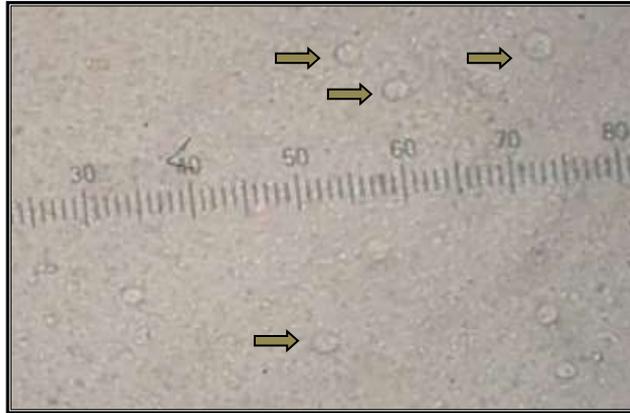
### ANEXO 7.3. PROCESO BÁSICO PARA LAS TINCIONES



**a)** Lavado y secado de las placas en posición inclinada, **b)** Limpieza de las placas al 70% y **c)** Observación de las placas en objetivos de 100x con aceite de inmersión

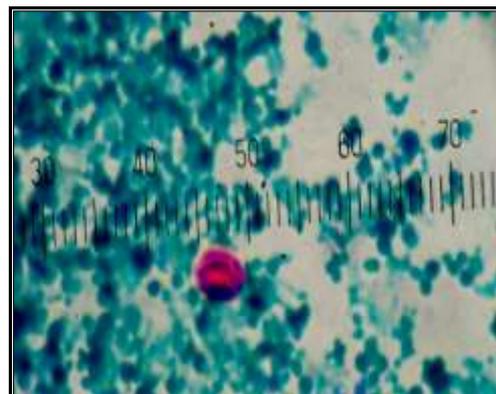
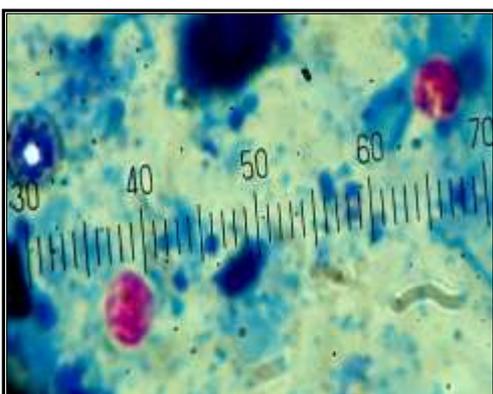
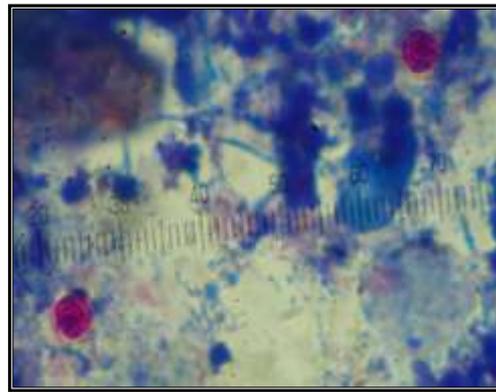
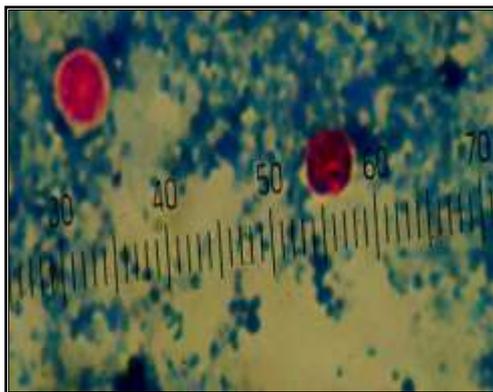
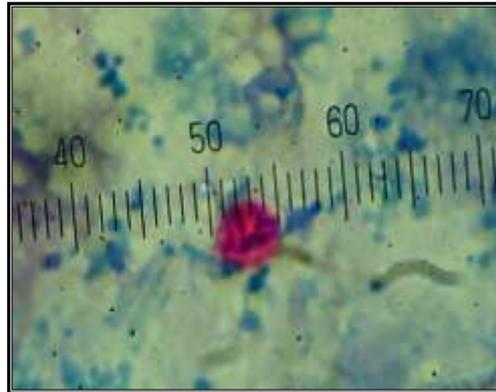
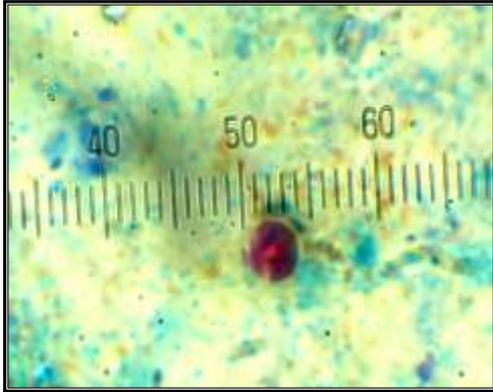
## ANEXO 8.

### FASE DOS: IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE OOQUISTES DE *Cryptosporidium* sp. EN FRESCO



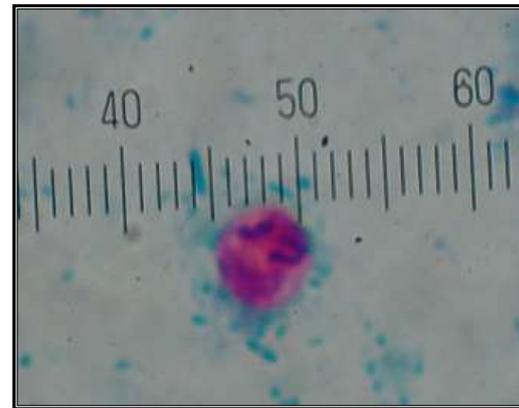
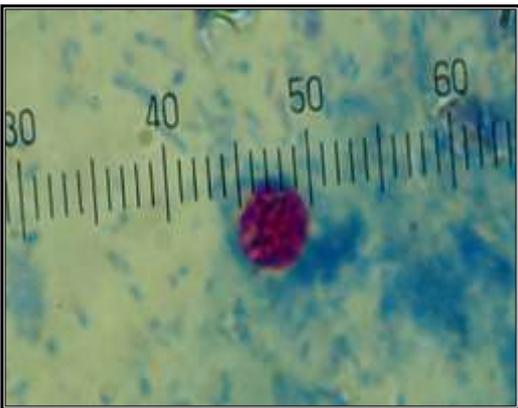
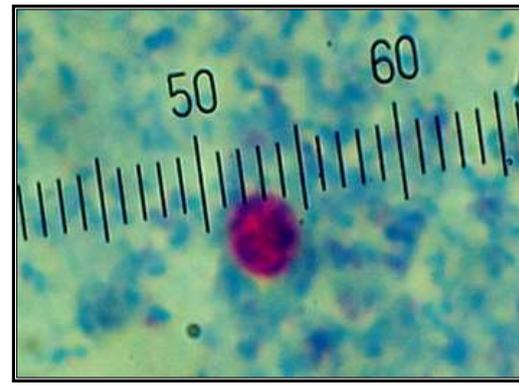
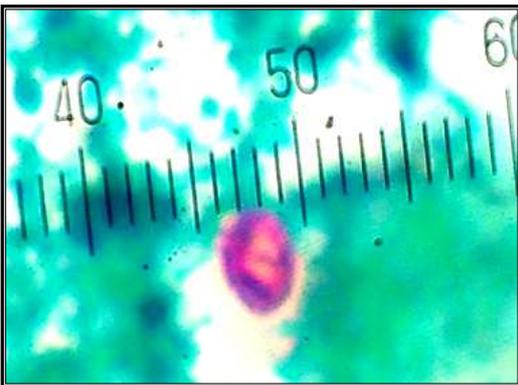
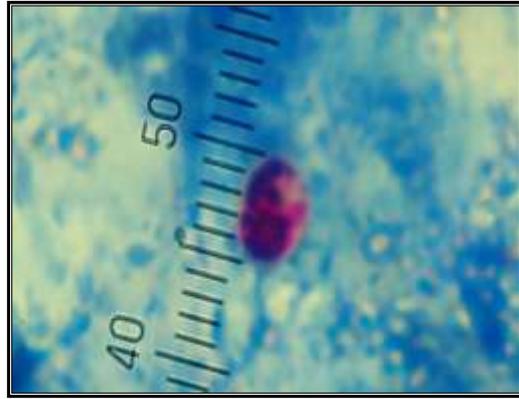
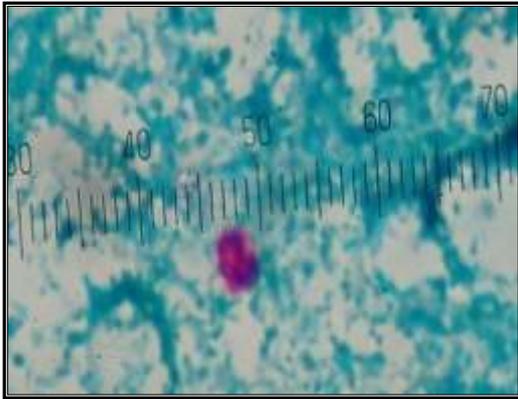
Observación microscópica a 100X, sin coloración de un extendido de material fecal fresco concentrado del caracol *L. fulica*, determinándose la presencia de ooquiste de *Cryptosporidium* sp.

**ANEXO 8.1.**  
**IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE OOQUISTES**  
***Cryptosporidium* sp. CON LA TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN**  
**MODIFICADA**



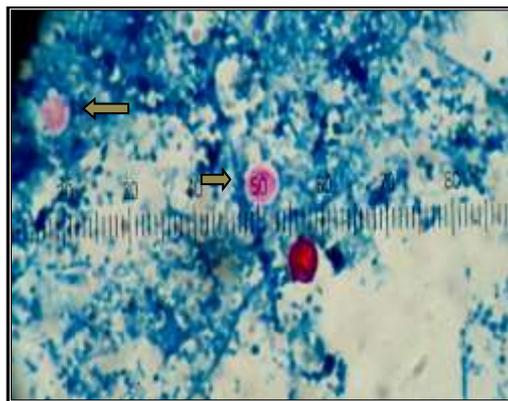
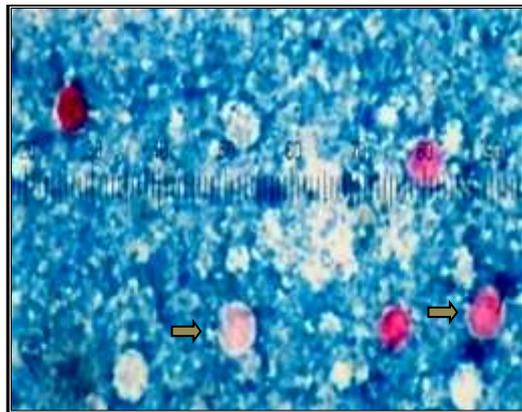
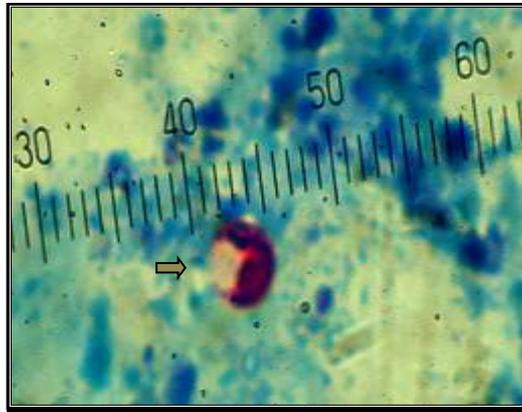
Identificación de numerosos ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en heces de caracoles *L. fulica* a 100X por la técnica de tinción Zielh Neelsen modificada observándose variabilidad de tamaño, captación del colorante y núcleos visibles en su estructura interna.

**ANEXO 8.2**  
**IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE OOQUISTES**  
***Cryptosporidium* sp. CON LA TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN**  
**MODIFICADA**



Identificación de numerosos ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en heces de caracoles *L. fulica* a 100X por la técnica de tinción Zielh Neelsen modificada observándose variabilidad de tamaño, captación del colorante y núcleos visibles en su estructura interna.

**ANEXO 8.3.**  
**IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE ARTEFACTOS CON LA**  
**TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN MODIFICADA**

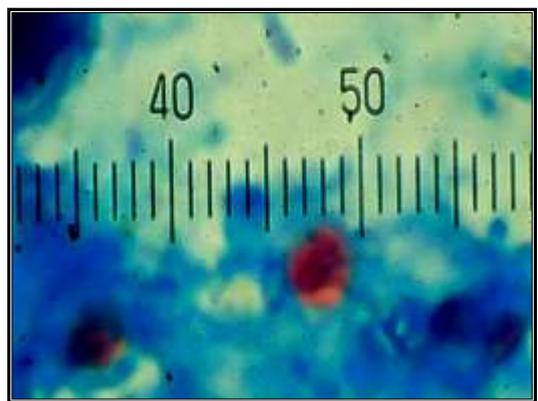
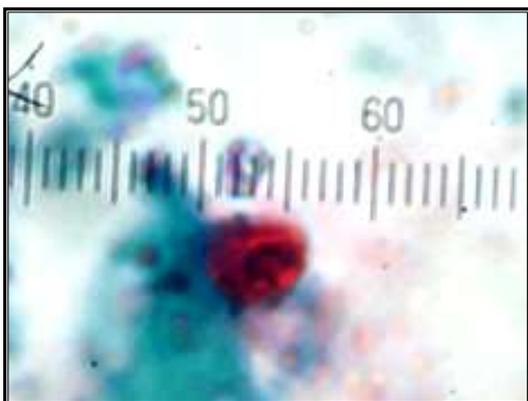
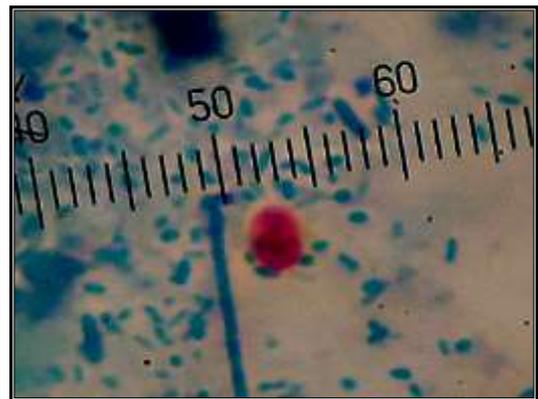
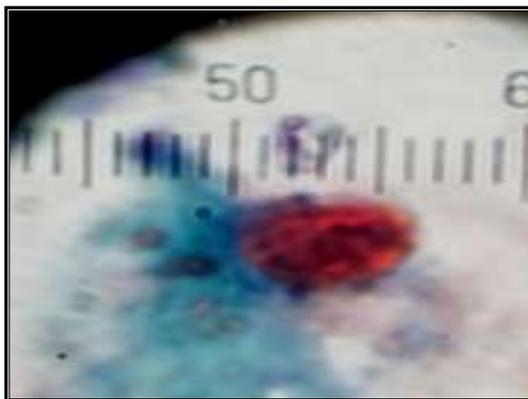
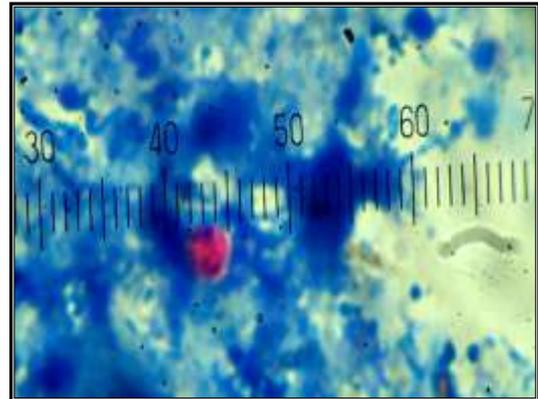
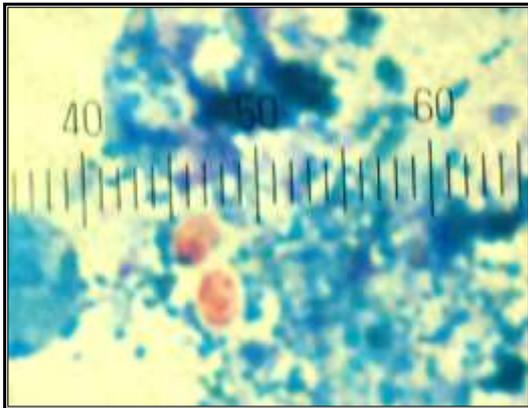


Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. con características más salientes junto a los cuerpos residuales que no son claramente visibles, llamados también fantasmas o artefactos que no son ooquistes.

#### ANEXO 8.4.

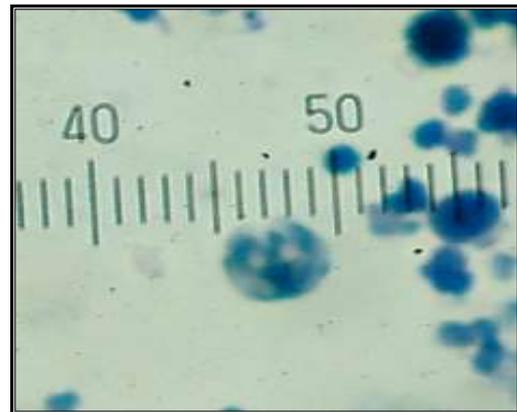
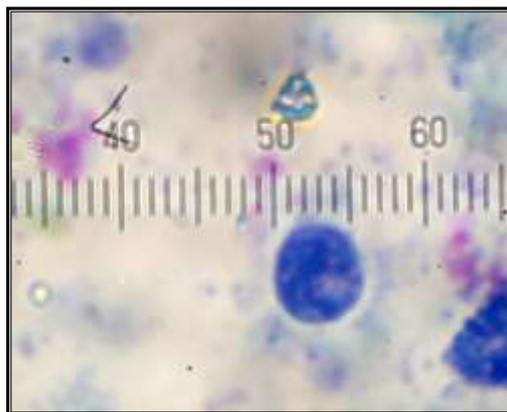
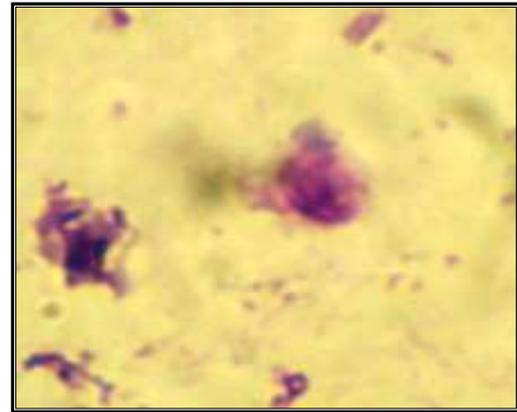
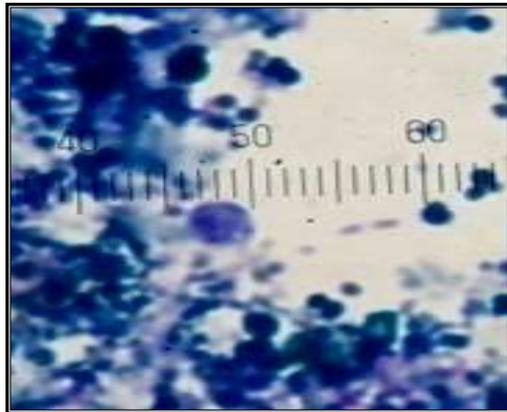
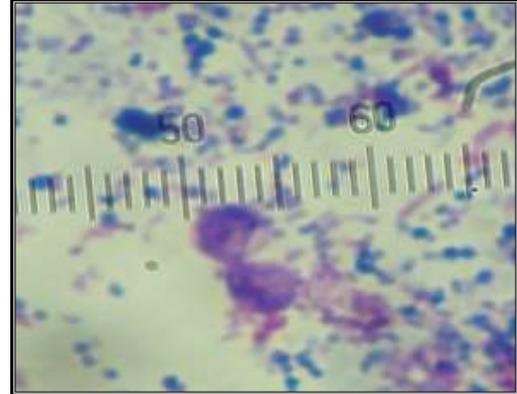
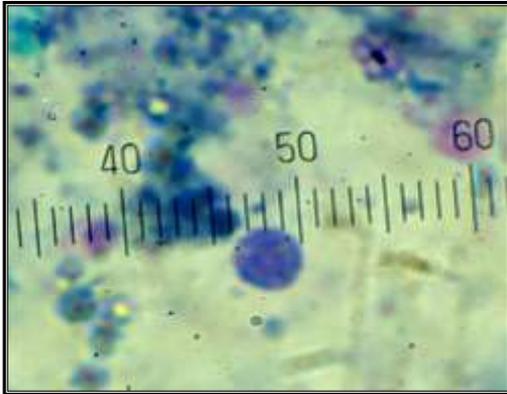
#### IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE OOQUISTES

#### *Cryptosporidium* sp. CON LA TINCIÓN DE SAFRANINA – AZUL DE METILENO



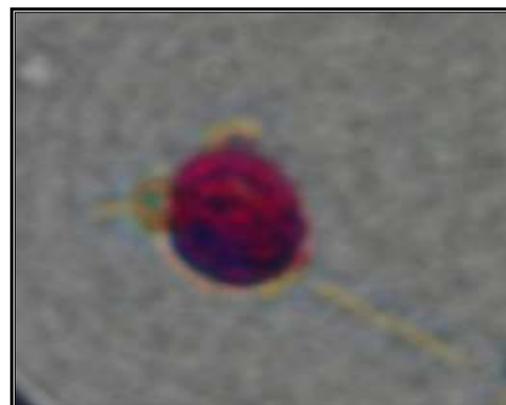
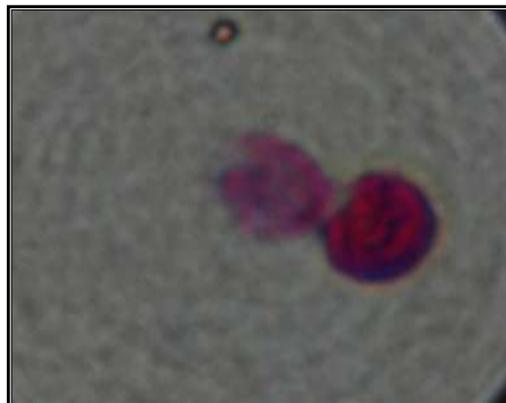
Identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en heces de caracoles *L. fulica* a objetivo 100X con la técnica de tinción Safranina observándose variabilidad de tamaño, captación del colorante y nucleos visibles en su estructura interna.

**ANEXO 8.5.**  
**IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE OOQUISTES**  
***Cryptosporidium* sp. CON LA TINCIÓN DE GIEMSA**



Identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en heces de caracoles *L. fulica* a objetivo 100X con la técnica de tinción Giemsa observándose variabilidad de tamaño, captación del colorante y núcleos visibles en su estructura interna.

**ANEXO 8.6.**  
**CONTROL EN HUMANO**  
**IDENTIFICACIÓN OOQUISTES DE *Cryptosporidium* sp. POR**  
**TÉCNICA DE TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN MODIFICADA**

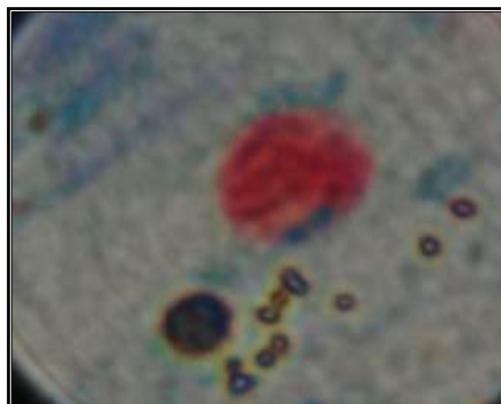
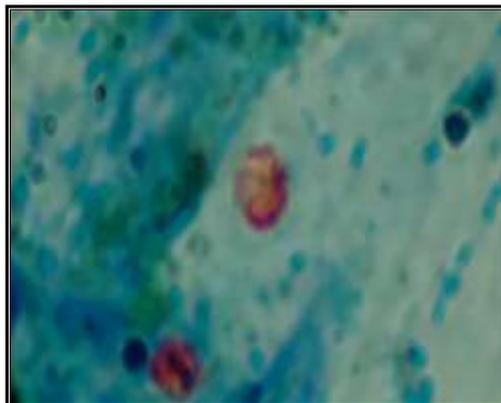
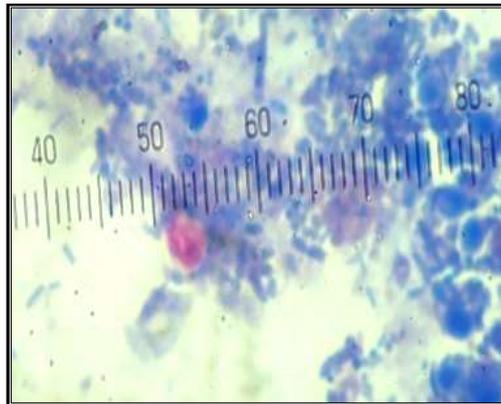


Imágenes patrón de ooquiste de *Cryptosporidium* sp. en muestras de heces de humanos con VIH positivos con la aplicación de la técnica de tinción Ziehl Neelsen modificada con objetivo de 100X.

## ANEXO 8.7.

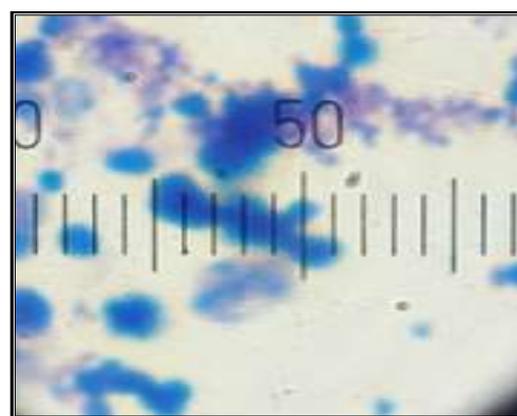
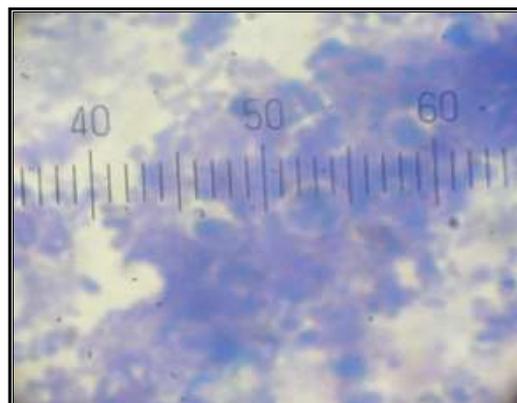
### CONTROL EN HUMANO

#### IDENTIFICACIÓN OOQUISTES DE *Cryptosporidium* sp. POR TÉCNICA DE TINCIÓN DE SAFRANINA – AZUL DE METILENO



Imágenes patrón de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en muestras de heces de humanos con VIH positivos con la aplicación de la técnica de tinción Safranina – Azul de metileno con objetivo de 100X.

**ANEXO 8.8.**  
**CONTROL EN HUMANO**  
**IDENTIFICACIÓN OOQUISTES DE *Cryptosporidium* sp. POR**  
**TÉCNICA DE TINCIÓN DE GIEMSA**



Imágenes patrón de oociste de *Cryptosporidium* sp. en muestras de heces de humanos con VIH positivos con la aplicación de la técnica de tinción Giemsa con objetivo de 100X.