

GUIA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE *Giardia* Y *Cryptosporidium* EN MUESTRAS DE AGUA

DIRECCION REDES EN SALUD PÚBLICA

SUBDIRECCIÓN LABORATORIO NACIONAL DE
REFERENCIA

GRUPO DE PARASITOLOGÍA

2018

Dirección

Martha Lucia Ospina Martínez
Directora General Instituto Nacional de Salud

Coordinación

Claudia Regina Llerena Polo
Director Técnico (E)
Redes en Salud Pública

Esther Cristina Barrios Linan
Subdirectora (E)
Laboratorio Nacional de Referencia

Martha Ayala Sotelo
Coordinadora
Grupo de Parasitología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Omayda Cárdenas Bustamante
Equipo Técnico
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección de Redes en Salud Pública

Elaborado por

Adriana Catherine Castillo Castañeda
Grupo de Parasitología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia (SLNR)
Dirección Redes en Salud Pública

TABLA DE CONTENIDO

OBJETIVOS DE LA GUÍA.....	4
ALCANCE.....	4
DEFINICIONES , SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRONIMOS	5
1 GENERALIDADES	7
1.1 Agentes etiológicos	7
1.1.1 <i>Cryptosporidium</i>	7
1.1.2 <i>Giardia</i>	8
1.2 Modo de transmisión	10
1.3 Prevención	10
2 DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO	10
2.1 Bioseguridad:.....	10
2.2 Toma de muestras	11
2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte.....	12
2.4 Documentación requerida.....	12
2.5 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico:	12
2.5.1 Protocolo EPA 1623.1 Para la Determinación de <i>Giardia</i> y <i>Cryptosporidium</i> en muestras de aguas.....	12
2.5.1.1 Filtración.....	12
2.5.1.2 Elución.....	13
2.5.1.3 Concentración	14
2.5.1.4 Separación Inmunomagnética	15
2.5.1.5 Detección - Confirmación.....	15
2.5.1.6 Limitaciones e interferencias del método de ensayo.....	17
2.5.2 Usos potenciales del diagnóstico molecular	18
3 CONTROL DE CALIDAD	18
3.1 Índice de Precisión Inicial	19
3.2 Índice de Precisión y Recuperación en el Tiempo	19
3.3 Matrix Spike y Duplicado de la Matrix Spike	19
4 VIGILANCIA POR LABORATORIO DE <i>Giardia</i> y <i>Cryptosporidium</i>.....	21
5 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA EL EVENTO.....	22
5.1 Ministerio de Salud y Protección Social.....	22
5.2 Superintendencia de Servicios públicos Domiciliados	23
5.3 Instituto Nacional de Salud.....	23
5.4 Laboratorios de Salud Pública Departamentales – LSP y del Distrito Capital	24
5.5 Prestadores de Servicio	25
5.6 Usuarios	25
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

OBJETIVOS DE LA GUÍA

Describir los lineamientos y el proceso de vigilancia por laboratorio de los parásitos *Giardia* y *Cryptosporidium* en muestras de agua de diferentes fuentes

Establecer los procesos de obtención, conservación y transporte de diferentes tipos de agua para la detección de *Giardia* y *Cryptosporidium*

Describir los fundamentos técnico-científicos de los métodos de ensayo empleados por el Instituto Nacional de Salud (INS) para el diagnóstico por laboratorio de *Giardia* y *Cryptosporidium* y las posibles variantes a través de dicho proceso

Precisar cómo se articula la red nacional de laboratorios para la vigilancia por laboratorio de *Giardia* y *Cryptosporidium*; así como, describir las funciones y responsabilidades de los diferentes actores en cada uno de los niveles

ALCANCE

La presente guía aplica para la vigilancia por laboratorio de *Giardia* y *Cryptosporidium* en diferentes tipos de agua, mediante la metodología EPA 1623.1 de 2012, adoptada por el Grupo de Parasitología de la Dirección de Redes en Salud Pública del INS.

DEFINICIONES, SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

Agua dulce natural o cruda: Es el agua natural que no ha sido sometida a procesos de tratamiento para su potabilización.

Agua de estanques de piscinas y estructuras similares: es aquella que cumple las características físicas, químicas y microbiológicas contempladas en la normatividad vigente expedida por el Ministerio de la Protección Social, usada con fines recreacionales.

Agua para Consumo Humano: es aquella que cumple con las características físicas, químicas y microbiológicas contempladas en la Resolución 2115 de 2007, expedida por el Ministerio de la Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y demás normas que la reglamenten. Esta es apta para consumo humano en bebida directa, en la preparación de alimentos o en la higiene personal

Agua Superficial: Agua proveniente de ríos, arroyos, nacedores, quebradas y lagunas

Agua Subterránea: agua proveniente de pozo profundo.

DAPI: 4'6'-diamidino-2-fenilindol - (DAPI)

Demostración de la capacidad inicial (IDC): Serie de ensayos en diferentes tipos de agua falseados con una concentración estandarizada de los parásitos de interés. Estos se deben realizar al iniciar la implementación del protocolo en cada laboratorio y cada vez que se realice alguna modificación en el mismo. Está conformado por un Blanco, Índice de Precisión y Recuperación Inicial, por sus siglas en inglés initial precision and recovery (IPR), Matrix Spike, por sus siglas en inglés (MS) / Blanco de Matrix Spike, por sus siglas en inglés (MSD).

Diagnóstico: Es el resultado obtenido a partir de un estudio, evaluación o análisis sobre determinado ámbito u objeto. Tiene como propósito reflejar la situación o estado real del ámbito u objeto de interés para poder proceder a tomar decisiones o realizar acciones de mejora.

Diagnóstico por Biología molecular: se basa en el diagnóstico de agentes biológicos en función de las características de su información genética. Esta herramienta se basa en la amplificación de una secuencia específica de ácidos nucleicos de los microorganismos de interés, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) la técnica más comúnmente usada, con sus diferentes variantes. A nivel mundial, el diagnóstico molecular se ha consolidado como un método de detección altamente sensible y específico.

DIC: Microscopía de contraste de interferencia diferencial, por sus siglas en inglés de (DIC)

EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés United States Environmental Protection Agency (US EPA).

FA: Microscopía de Inmunofluorescencia, por sus siglas en inglés de (FA)

FITC: Tinción de fluorescencia con Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato, por sus siglas en inglés de (FITC).

Fuente de abastecimiento: Depósito o curso de agua superficial o subterránea, utilizada en un sistema de suministro a la población, bien sea de aguas atmosféricas, superficiales, subterráneas o marinas.

IDC: Demostración inicial de la capacidad del laboratorio, initial demonstration of laboratory capability por sus siglas en inglés de (IDC).

IMS: Separación inmunomagnética, immunomagnetic separation por sus siglas en inglés (IMS)

IPR: Índice de Precisión y Recuperación Inicial, es un cálculo que se realiza al comenzar la implementación de la técnica, para verificar la capacidad de recuperación de una concentración estandarizada adicionada de quistes y ooquistes. Para su cálculo, se analizan por separado 4 muestras de agua grado reactivo contaminadas con estándares pre-cuantificados de *Giardia* y *Cryptosporidium* y una muestra blanco (sin contaminar), el promedio de los resultados obtenidos es comparado según parámetros establecidos en el Protocolo EPA 1623.1.

LNR: Laboratorio Nacional de Referencia

LSP: Laboratorio de Salud Pública

MS/MSD (Matrix Spike/Duplicado de Matrix Spike): Tipo de muestra de interés (Agua para consumo humano, agua superficial, agua subterránea, agua de piscina) que se contamina con estándares precuantificados de quistes y ooquistes para verificar la recuperación que exige el aseguramiento de la calidad del método.

OPR: Índice de Precisión y Recuperación en el tiempo, ongoing precision and recovery por sus siglas en inglés (OPR) este se realiza luego de realizar 20 análisis del mismo tipo de agua o una vez al año (lo que primero ocurra), para comprobar que se sigue cumpliendo con la recuperación mínima de quistes/ooquistes que exige el aseguramiento de la calidad del método.

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa en tiempo real, conocida como qRT-PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction whit Transcription Real Time)

RSD: Desviación estándar relativa, por sus siglas en inglés de Relative Standar Desviation(RSD)

Sistema para la protección y control de la calidad del agua para consumo humano: Es el conjunto de responsables, instrumentos, procesos, medidas de seguridad, recursos, características y criterios organizados entre sí para garantizar la calidad del agua para consumo humano en la población.

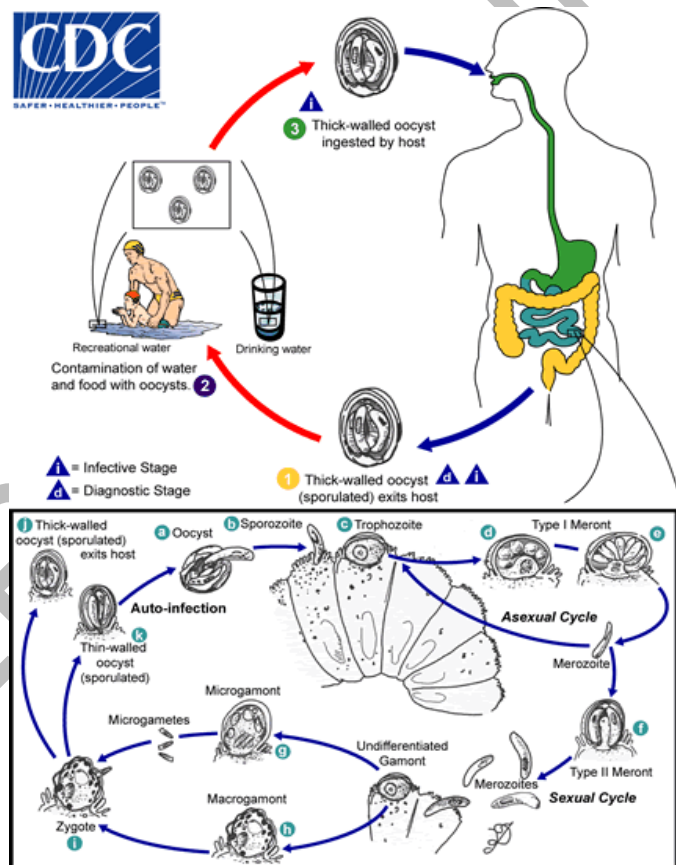
Vigilancia de la calidad del agua para consumo humano: Es el conjunto de acciones periódicas realizadas por la autoridad sanitaria o por las personas prestadoras que suministran o distribuyen agua para el consumo humano en municipios de más de cien mil (100.000) habitantes, según el caso, para comprobar y evaluar el riesgo que representa a la salud pública la calidad del agua distribuida por los sistemas de suministro de agua para consumo humano; así como, para valorar el grado de cumplimiento de las Buenas Prácticas Sanitarias y demás disposiciones establecidas en el decreto 1575 de 2007.

1 GENERALIDADES

1.1 Agentes etiológicos

1.1.1 ***Cryptosporidium***: Es un parásito protozoario de la subclase *Coccidia* que se localiza a nivel intracelular en el intestino delgado de humanos y animales. La especie patógena exclusivamente de humanos es *Cryptosporidium hominis* (anteriormente *C. parvum* genotipo 1), la especie reportada tanto en humanos como en varios animales es *C. parvum* (genotipo 2) (Xiao, Fayer, Ryan, & Upton, 2004); sin embargo, hay otras especies propias de animales (mamíferos, reptiles, aves y peces) que pueden afectar a humanos (Xiao et al., 2004).

Figura 1. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp.



Fuente: Tomado de <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>

La infección comienza vía oral, con la ingestión de ooquistes de *Cryptosporidium* a través del consumo de agua o alimentos contaminados. Una vez el parásito alcanza el intestino del

huésped, este se reproduce asexualmente, formando los merozitos. Estas formas parasitarias llevan a cabo la reproducción sexual del ciclo de vida en los enterocitos, dando origen a los zigotes y posteriormente los ooquistes. Estos últimos son expulsados por medio de la materia fecal contaminando el agua (Figura 1) (Botero & Restrepo, 2012).

La Criptosporidiosis es una infección causada por los parásitos protozoarios del género *Cryptosporidium*. Afecta el intestino delgado de animales y el ser humano, principalmente el yeyuno. El periodo de incubación es de aproximadamente 7 días (DuPont et al., 1995). En los seres humanos, la criptosporidiosis provoca diarrea acuosa severa incluso con fiebre, deshidratación, dolor abdominal, náuseas y vómito; en casos crónicos, se presenta mala absorción nutricional lo que desencadena a desnutrición (Botero & Restrepo, 2012).

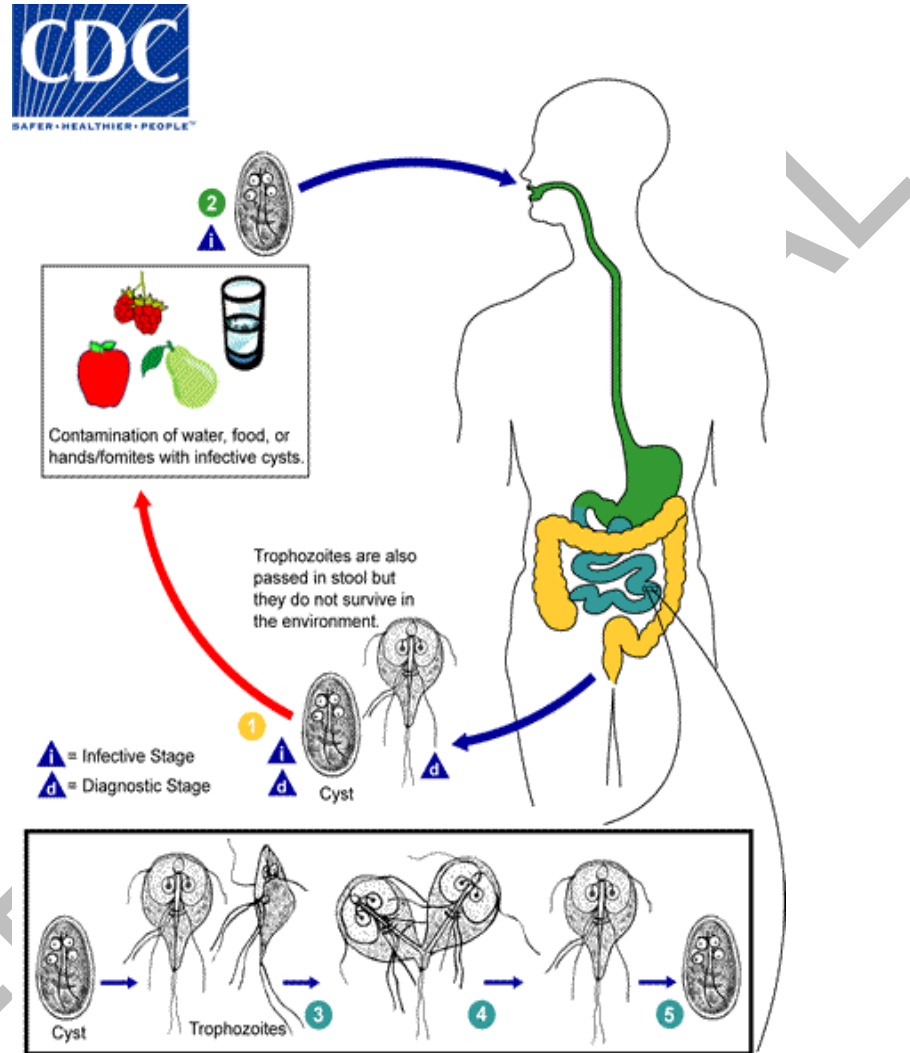
Este parásito puede diseminarse a diferentes órganos del cuerpo (estómago, pulmón, esófago, faringe, colon y recto), principalmente en pacientes inmunocomprometidos (Clavel et al., 1996; DuPont et al., 1995; Quesada-Lobo L, 2012), lo que representa un gran riesgo para la vida.

- 1.1.2 **Giardia:** Es un parásito protozoario patógeno de humanos y animales causante de enfermedad gastrointestinal, se localiza en el intestino delgado, la vía de transmisión es fecal-oral por consumo de agua y alimentos contaminados con quistes. Se han descrito varios genotipos (Botero & Restrepo, 2012), de los cuales, los que se asocian a infección en humanos principalmente son el A1, A2 y el B; en el caso de los animales se han asociado los genotipos C, D y E (Kohli et al., 2008; Ravid, Duque, Arévalo, Nicholls, & Wasserman, 2007).

La infección comienza vía oral con la ingestión de quistes de *Giardia*. Cuando el quiste llega al intestino delgado libera 4 trofozoítos. Estos tienen forma piriforme y en el centro presenta dos núcleos unidos, el tamaño es de aproximadamente 15 μm de longitud por 7 μm de ancho, posee una ventosa en la zona anterior del cuerpo, la cual es usada por el parásito para fijarse a las paredes intestinales; además, se caracteriza por tener un axostilo en la parte central, el cual se encuentra atravesado por dos cuerpos parabasales, del cual emergen 4 flagelos (Botero & Restrepo, 2012).

En el intestino, los trofozoítos se reproducen por fisión binaria; cuando estos caen a la luz del intestino dan lugar a los quistes. Estos son expulsados en la materia fecal y contaminan el agua y los alimentos, etc, (Figura 2). Los quistes pueden ser ovales o redondos, poseen doble membrana y dos o cuatro núcleos; el tamaño típico es de 8 a 18 μm de largo y 5 a 15 μm de ancho.

Figura 2. Ciclo de vida de la *Giardia*



Fuente: Tomado de <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>

La Giardiasis es una infección del intestino delgado producida por el protozoo flagelado *Giardia duodenalis* (syn. *G. lamblia*, *G. intestinalis*). Este provoca dolor abdominal difuso, diarrea y alteración de la absorción de nutrientes debido a la inflamación de la mucosa del duodeno y el yeyuno. Este último signo de la infección se presenta principalmente en los casos crónicos. En los niños la infección crónica causa retraso en el crecimiento, ganancia de peso y capacidades cognitivas (Mohammed Mahdy, Lim, Surin, Wan, & Al-Mekhlafi, 2008).

1.2 Modo de transmisión de *Cryptosporidium* y *Giardia*: Se conocen cuatro mecanismos de transmisión de los parásitos *Giardia* y *Cryptosporidium*, los cuales conllevan a la mayoría de las infecciones humanas:

- Directamente por la ingestión de ooquistes/quistes, excretados en heces de seres humanos y algunos animales, a través del contacto con manos contaminadas con materia fecal (Núñez, López, de la Cruz, & Finlay, 2003)
- Transmisión por agua, por medio de este mecanismo se han producido epidemias y endemias. En la literatura se ha reportado la transmisión por medio del agua superficial usada en acueductos (Gallas-Lindemann et al., 2016; Juranek, 1995), aguas recreacionales (Shields, Gleim, & Beach, 2008), y aguas de riego (Ensink, van der Hoek, & Amerasinghe, 2006).
- Transmisión por consumo de alimentos contaminados con quistes/ooquistes, esta se produce a raíz del riego o la inadecuada manipulación de los mismos (Mohammed Mahdy et al., 2008) (Lengerich, Addiss, Marx, Ungar, & Juranek, 1993).
- Transmisión zoonótica, demostrada por la contaminación con quistes presentes en heces de animales (Fayer & Ungar, 1986).

1.3 Prevención: Dentro de los mecanismos de prevención científicamente comprobados están:

- Evitar el consumo de agua cruda: el agua debe ser tratada en la planta de tratamiento de agua potable (PTAP), el mecanismo más efectivo usado en los acueductos para la eliminación de quistes/ooquistes es la filtración de alta calidad, ya que estas estructuras parasitarias son altamente resistentes al cloro y otros agentes químicos usado en las plantas de potabilización.
- En lo posible, el agua de consumo debe ser hervida a 65°C durante 10 minutos para eliminar los quistes de *Giardia* y ooquistes *Cryptosporidium*.
- Higiene personal adecuada y buenas prácticas de higiene; por ejemplo, lavarse las manos con frecuencia, principalmente después de ir al baño y antes de preparar alimentos.
- Saneamiento ambiental.
- Cocción rápida y/o adecuado lavado de vegetales y frutas.
- Medidas profilácticas con el uso periódico de antiparasitarios, principalmente en población escolar.

2 DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO

2.1 Bioseguridad: Las muestras de cualquier tipo de agua (agua cruda o agua tratada) recolectadas para la “determinación de *Giardia* y *Cryptosporidium*”, que sean remitidas al Grupo de Parasitología de la Dirección Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud, deberán cumplir con la normatividad vigente para envío y transporte de muestras biológicas a nivel nacional o internacional. El envío de las muestras de agua debe realizarse en lo posible el mismo día de su recolección. La muestra debe ser protegida de la luz solar directa y cambios bruscos de temperatura. Por lo que, se debe garantizar la conservación y transporte de la muestra en una temperatura entre los 1 a 10 °C.



Durante la toma, manejo, transporte, procesamiento y almacenamiento de cualquier tipo de muestra de agua, se debe considerar como *“potencialmente peligrosa y se deben tomar las precauciones necesarias para prevenir que ocurra una infección con agentes biológicos”*; por lo cual, se deben utilizar los elementos de protección personal y aplicar rigurosamente las medidas de bioseguridad.

2.2 Toma de muestras: Para la toma y recolección de las muestras se debe garantizar la limpieza del área, no tener desechos o residuos a su alrededor. Para el análisis se requiere un volumen mínimo de 10 L, por lo tanto, se debe garantizar un transporte seguro en un recipiente con tapa rosca y con contratapa para evitar fugas y derrames. Previendo que durante el transporte se pierda contenido, se sugiere recolectar dos litros de más (es decir enviar un total de 12L). La recolección de la muestra varía según el origen así:

Agua tratada - muestras del grifo: se debe realizar limpieza y desinfección del grifo, con alcohol y en lo posible por flameo (siempre que el grifo y la tubería sean metálicas). Posteriormente, se abre la llave y se permite el flujo continuo de agua durante un tiempo mínimo de dos (2) minutos. Esta acción garantiza el arrastre de elementos estancados, regulación de la temperatura y turbiedad. Teniendo cerca el mechero, se procede a abrir el galón de polietileno de baja densidad y se realizan tres purgas del envase; enseguida, se comienza la recolección de la muestra. Finalmente, se pone el tapón y se cierra debidamente el galón con la tapa rosca.

Agua superficial: con la ayuda de un balde limpio se recolecta en una sola toma el volumen de agua requerido, se realizan tres purgas del envase y trasvasa la muestra directamente al galón. Finalmente, se pone el tapón y se cierra debidamente el galón con la tapa rosca.

Nota: Si se posibilita el acceso de la persona encargada del muestreo al afluente de agua, igualmente se realizan tres purgas al galón y se recolecta la muestra directamente.

En los casos en los que el usuario cuenta con el sistema de filtración (Envirochek o Idexx), este puede enviar la muestra ya filtrada en la cápsula Envirochek o el módulo de filtración de Idexx siempre que garantice las condiciones y requisitos descritos en este numeral (volumen de muestra filtrada, caudal de filtración y condiciones de recolección de la muestra). La cápsula o modulo filtrante debe ser enviado debidamente rotulado y refrigerado.



2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte: Los tipos de muestra para la determinación de *Giardia* y *Cryptosporidium*, pueden ser agua superficial (cruda), agua para consumo humano (tratada), agua subterránea (pozo profundo) y agua de recreacional (piscina o estanque).

Toda muestra de agua enviada al INS, debe cumplir con óptimas condiciones de calidad en la obtención, conservación y transporte; con el fin de asegurar calidad durante la fase analítica y post analítica; no solo en beneficio del usuario, sino para la toma de decisiones en salud pública, teniendo en cuenta que las muestras que se remiten al INS generalmente llegan con fines de diagnóstico, confirmación o investigación de brotes o emergencias.

Nota: La muestra de agua (o la muestra ya filtrada) se conservará refrigerada de 1 a 10°C, desde la recolección de la muestra hasta el inicio del procesamiento del ítem de ensayo en el laboratorio.

2.4 Documentación requerida: Toda muestra de agua enviada para análisis de *Giardia* y *Cryptosporidium*, debe estar acompañada con oficio remitente o carta de solicitud y acta de toma de muestra, documentos que deben contar con un mínimo de información como; dirección, ubicación, punto de toma de la muestra, fecha y hora de recolección, temperatura de la muestra, tipo de muestra, nombre del solicitante, muestreado por, nombre persona que recolectó la muestra y entidad remitente; es recomendable incluir el dato de turbiedad, pH y cloro residual (según sea el caso).

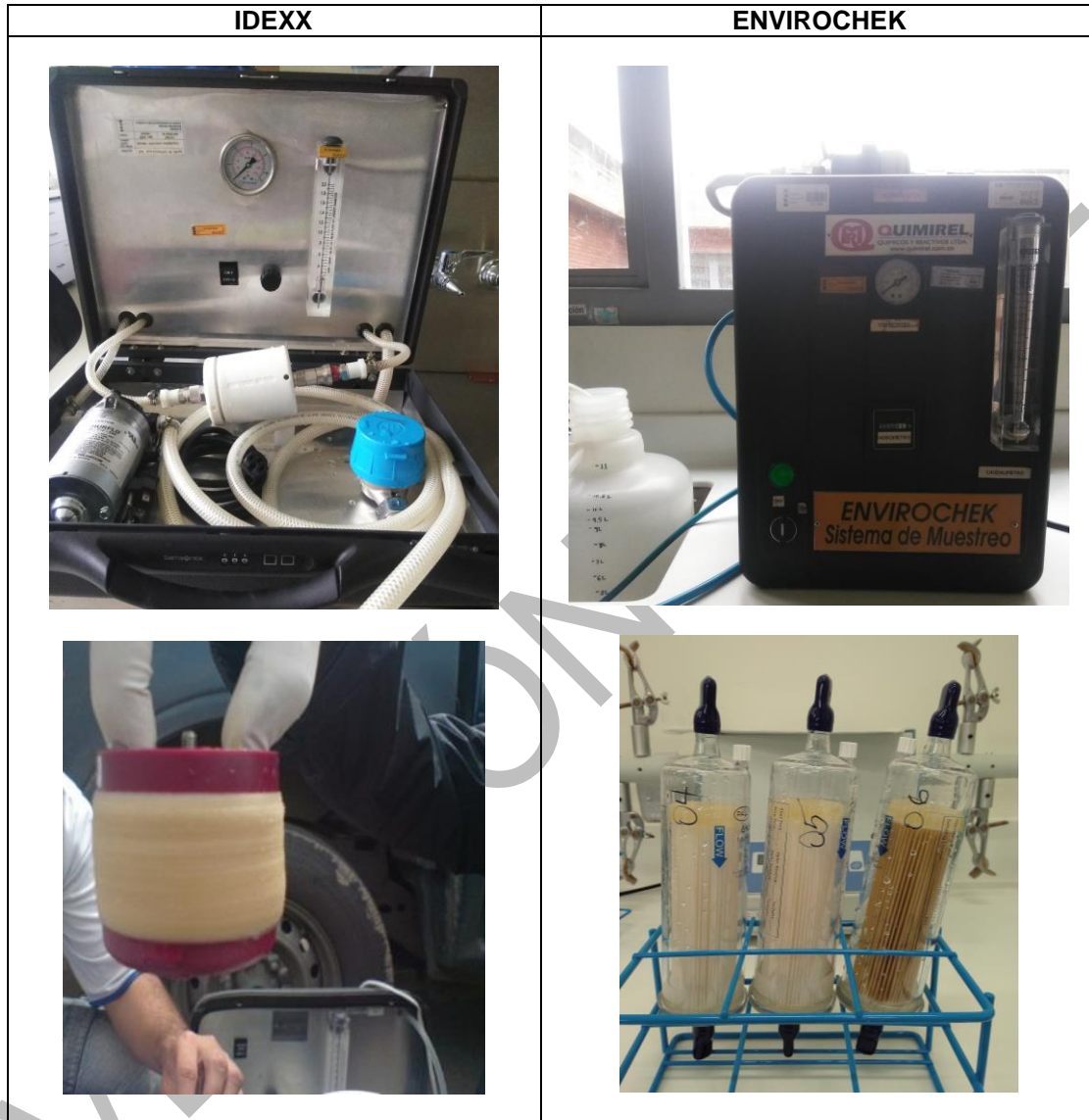
Para las muestras ya filtradas en campo, cada módulo y/o cápsula de filtración, debe especificar la hora inicial y final de la filtración; así como, la cantidad de litros de agua filtrados.

2.5 Métodos de Laboratorio empleados por el LNR para el diagnóstico del agente etiológico

2.5.1 Protocolo EPA 1623.1 Determinación de *Giardia* y *Cryptosporidium* en muestras de aguas: Este método desarrollado por la EPA fue adoptado por Colombia para la detección de ooquistes del género *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en muestras de agua. El método se realiza mediante concentración, separación inmunomagnética (IMS), microscopía de inmunofluorescencia (FA), 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC), como se explica a continuación.

2.5.1.1 Filtración: se realiza la captura de las formas quísticas de los parásitos de interés; a partir de diferentes tipos de agua, mediante el uso de un filtro con tamaño de poro de 1 µm (Figura 3). Comercialmente se disponen de cápsulas de filtración Envirochek y módulos de filtración Idexx. Los cuales son utilizados para sistemas diferentes de filtración como se muestra a continuación.

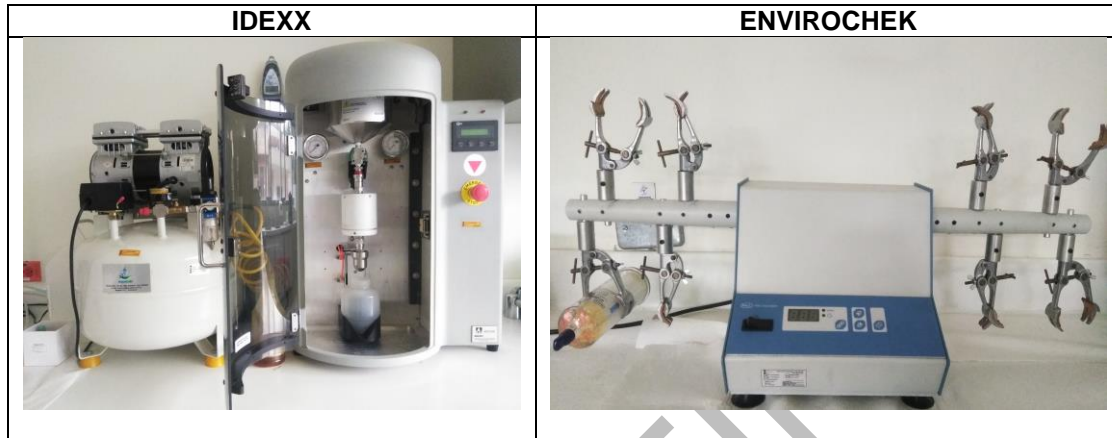
Figura 3. Sistemas de filtración y tipos de filtros usados en el protocolo EPA 1623.1



Fuente: Fotos, Grupo de Parasitología. LNR

2.5.1.2 **Elución:** Procedimiento que se realiza con el fin de extraer los quistes y ooquistes atrapados en el filtro durante la fase anterior, usando el buffer indicado según el método de filtración usado (Figura 4).

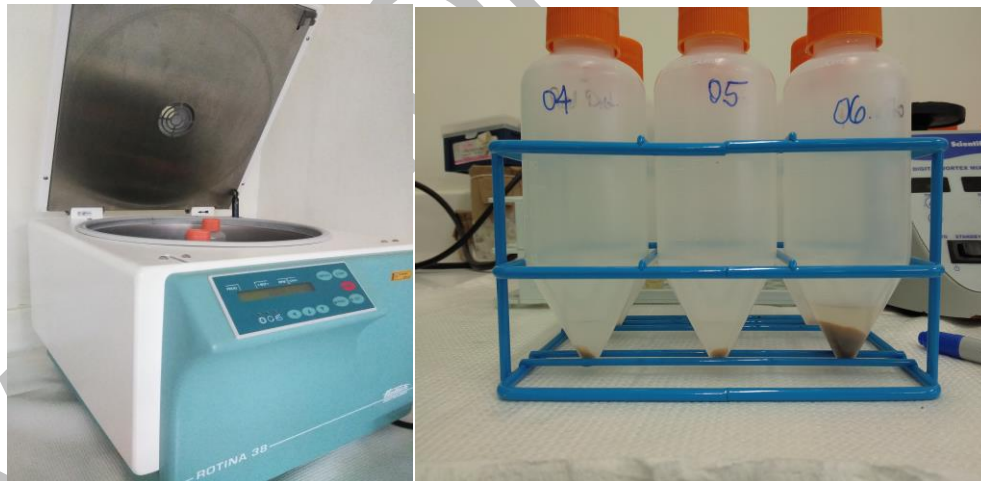
Figura 4. Sistemas de elución usados en el protocolo EPA 1623.1



Fuente: Fotos, Grupo de Parasitología. LNR

2.5.1.3 **Concentración:** Se realiza por medio de centrifugación para obtener el sedimento extraído proveniente de la elución (Figura 5).

Figura 5. Concentración de pellet por medio centrifugación del volumen eluido a partir de una muestra de agua para consumo humano (muestras 04 y 05) y agua superficial (muestra 06)



Fuente: Fotos, Grupo de Parasitología. LNR

2.5.1.4 **Separación inmunomagnética:** Los ooquistes y quistes presentes en el sedimento se purifican mediante el uso de imanes y partículas cargadas magnéticamente (perlas de cobre) recubiertas por anticuerpos específicos para cada especie; los cuales se unen al antígeno específico identificado en la superficie de cada parásito (Figura 6).

Figura 6. Separación inmunomagnética - Periodo de incubación de la muestra con las perlas de cobre recubiertas con anticuerpos *Anti-Cryptosporidium* y *Anti-Giardia*



Fuente: Fotos, Grupo de Parasitología. LNR

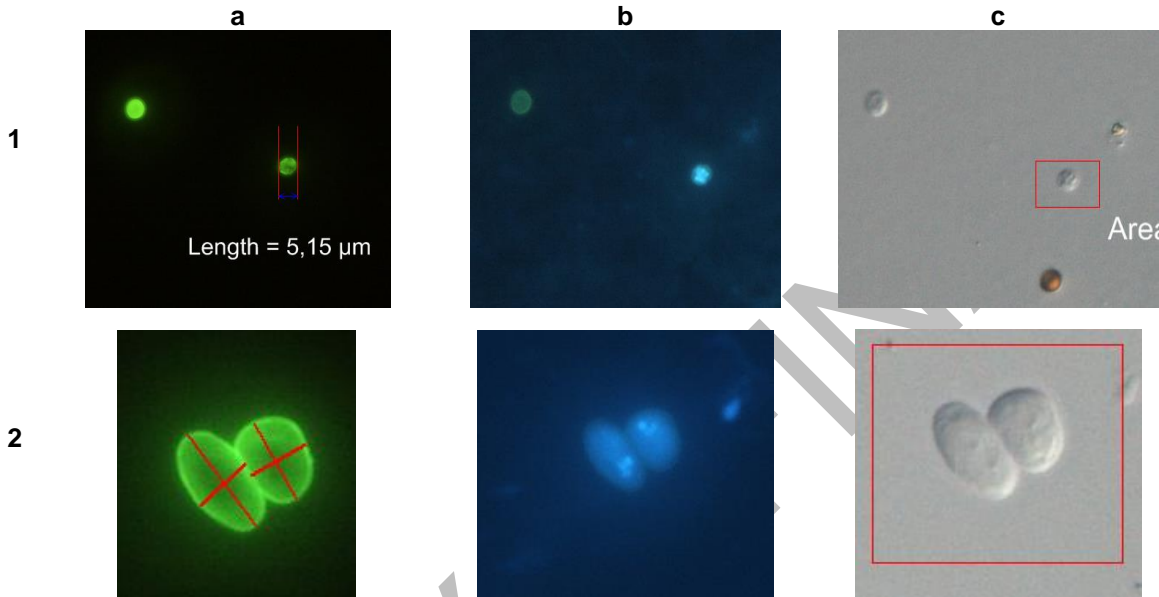
2.5.1.5 Detección – Confirmación: se identifican los ooquistes y quistes mediante tinción de fluorescencia con isocianato de fluoresceína (FITC), 4´6´-diamino2-fenolindol (DAPI) y microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC), (Figura 7).

Para validar la calidad de la coloración, se verifica que el control positivo (Provisto en el kit de coloración) y el control negativo (PBS) sean aceptables antes de proceder a la evaluación de la lámina. Para esto se deben caracterizar tres ooquistes de *Cryptosporidium* y tres quistes de *Giardia*, la evaluación de FITC se realiza en 20X y 40 X y la evaluación de DAPI y DIC en 40x y 100X.

La verificación de los controles positivo y negativo se debe realizar obligatoriamente antes de analizar las muestras; el control negativo para confirmar que no tiene ooquistes o quistes y el control positivo para validar la calidad de la coloración y el adecuado funcionamiento del microscopio.

La evaluación de las muestras en FITC se realiza en 20X observando fluorescencia verde manzana de quistes y ooquistes con bordes brillantes, incrementar la resolución a 40X y observar en DAPI y DIC (Figura 1a y 2a). La evaluación de DAPI se realiza observando en 40X tinción interna de azul intenso, se observan hasta cuatro núcleos diferenciados y de color azul cielo (Figura 1a y 2b). La evaluación DIC se realiza en 100X observando forma, número de núcleos y presencia de esporozoitos, cuerpo medio y axonema según la forma quística (Figura 1a y 2b).

Figura 7. Lectura de las muestras en microscopio de epifluorescencia. Visualización de ooquistes de *Cryptosporidium* en FITC (1a), DAPI (1b) y DIC (1c) y quistes de *Giardia* en FITC (2a), DAPI (2b) y DIC (2c)



Fuente: Fotos, Grupo de Parasitología. LNR

Nota: Por medio de este protocolo solo es posible determinar presencia o ausencia de cada género parasitario. La técnica no permite determinar viabilidad de los quistes/ooquistes ni determinar la especie hallada en la muestra.

En el mercado, existen técnicas para la detección de *Giardia* y *Cryptosporidium* en diferentes tipos de muestras de aguas; sin embargo, la técnica diagnóstica estandarizada y validada en Colombia es la adoptada a partir de la EPA 1623.1 Filtración/IMS/FA. Actualmente, se explora la posibilidad de validar el uso de diagnóstico molecular para este fin; lo anterior, en busca de obtener una mayor especificidad y sensibilidad diagnóstica; aumentar la cobertura diagnóstica a nivel nacional, de acuerdo con la capacidad técnica instalada de los Laboratorios de Salud Pública del país.

Es importante tener en cuenta los tiempos máximos permitidos por el protocolo para la ejecución de cada una de las fases del ensayo, ya que de esto depende en gran parte el buen diagnóstico del evento (Tabla 1).

Tabla 1. Tiempos de procesamiento de las muestras para la Determinación de *Giardia* y *Cryptosporidium* en muestras de agua

Etapa de procesamiento de la muestra	Tiempo máximo permisible entre paradas (las muestras deben ser procesadas tan pronto como sea posible)
Recolección Filtración	Hasta 96 horas están permitidas entre la recolección de la muestra o filtración en campo y el inicio de la elución
Elución Concentración Purificación Montaje en lámina Secado de la muestra	Estos pasos deben ser completados en el trabajo de un (01) día
Tinción	Hasta 72 horas están permitidas desde el montaje de la muestra purificada en la lámina hasta la tinción
Evaluación	Hasta siete (07) días están permitidos entre la tinción de la muestra y la evaluación

Fuente: Tomado de EPA 1623.1 de 2012

2.5.1.6 Limitaciones y/o Interferencias del Método de Ensayo: La turbiedad causada por desechos orgánicos e inorgánicos principalmente en las muestras de agua cruda y la presencia de desechos como lodos, algas, químicos y polímeros durante el proceso de tratamiento, pueden interferir en el proceso de filtración de la muestra, concentración, separación y observación de los quistes de *Giardia* y oquistes de *Cryptosporidium*.

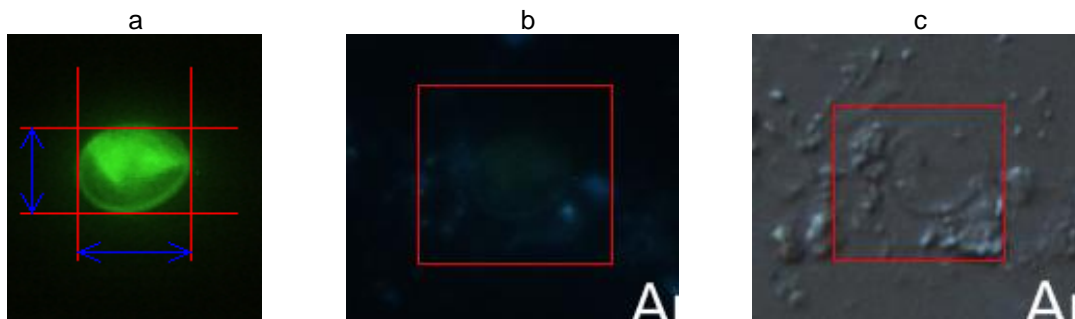
Igualmente, existen microorganismos y desechos que presenten inmunofluorescencia no específica ó autofluorescencia. Un ejemplo claro de ello son las algas, las cuales fácilmente pueden ser confundidas con quistes de *Giardia* al ser observadas en el filtro para FITC; por lo que es fundamental realizar una buena caracterización morfológica de las estructuras en cuanto a medición con micrómetro del ancho y largo de la estructura, fluorescencia con DAPI para observar los núcleos y la microscopia de fases para reconocer estructuras internas como núcleos, axonema y cuerpo medio (Figura 8).

La congelación de las muestras de agua durante el transporte o el almacenamiento puede interferir con la detección de quistes y oquistes, debido a que ocasiona deterioro y daño estructural en la membrana de los parásitos.

Reactivos, solventes, equipos de laboratorio y otros sistemas para procesamiento de muestras pueden producir artefactos que pueden causar mala interpretación en la observación al microscopio de los quistes y oquistes.

La limpieza de los equipos debe realizarse según las especificaciones del fabricante; así mismo, se recomienda que los elementos utilizados durante el proceso como puntas de micropipetas, pipetas pasteur plásticas y de vidrio, tubos eppendorf de 1.5ml y 15ml, etc sean desechables, con el fin de evitar contaminación de las muestras.

Figura 8. Alga contenida en muestra de agua cruda vista en FITC(a), DAPI (b) y DIC (c)



Fuente: Fotos, Grupo de Parasitología. LNR

- 2.5.2 **Usos potenciales del diagnóstico molecular:** A través de los años, y con el creciente desarrollo de tecnologías moleculares, se han logrado significativos avances en el desarrollo de metodologías para la investigación sanitaria, medioambiental y la detección a nivel clínico de agentes parasitarios en muestras tanto clínicas como ambientales.

Actualmente, los registros de estadísticas de análisis ambientales de muestras de aguas en relación con estos patógenos parasitarios se ha llevado por medio del uso de la técnica de qRT-PCR, esta técnica permite determinar la presencia de estos microorganismos en muestras de agua de cualquier fuente, de manera costo-efectiva, disminuyendo tiempos de procesamiento, aumentando sensibilidad y especificidad. En nuestro país, se hace necesario estar a la vanguardia de las nuevas estrategias diagnósticas, por lo que se pretende a mediano plazo poder implementar esta herramienta, estandarizarla y validarla; y posteriormente transferirla a los LSP que cuenten con la capacidad técnica para implementarla y así mejorar la cobertura a nivel nacional en la determinación de *Giardia* y *Cryptosporidium* en muestras de agua.

3 CONTROL DE CALIDAD

Con el fin de evitar ambigüedades o malas interpretaciones por parte del lector la siguiente información es tomada en detalle del Protocolo EPA 1623.1 de 2012. Los requerimientos analíticos mínimos de este método consisten en una demostración inicial de la capacidad del laboratorio (IDC), el cual se compone de la prueba de precisión y recuperación inicial (IPR) y demostraciones a lo largo del análisis por parte del laboratorio sobre su capacidad de realizar ensayos de contaminación de matrices o Matrix spike (MS), además de un blanco y la precisión y recuperación (OPR) a través del tiempo, así como, el control de la coloración. El desempeño del laboratorio debe ser comparado, para establecer un criterio de sus procedimientos y así poder determinar si los resultados de los análisis cumplen con las exigencias del método.

3.1 Índice de Precisión Inicial (IPR): Este índice se calcula como control Inicial del método dentro de los procesos de validación de este. Para cada parasito se calcula el porcentaje de recuperación (R) usando la siguiente ecuación:

$$R = 100 \times (N/T)$$

R= porcentaje de recuperación
N= número contado de ooquistes y quistes
T= número de ooquistes y quistes adicionados

Usando el porcentaje de recuperación (R) de los cuatro análisis, calcular la media del porcentaje de recuperación y la desviación estándar relativa (RSD) de las recuperaciones para *Cryptosporidium* y para *Giardia*. La RSD es la desviación estándar dividida por la media, multiplicado por 100. Comparar la **media** y el **RSD** al correspondiente criterio de aceptación del desempeño del método para una precisión y recuperación inicial con lo descrito en la tabla 2 y 3. Si la **media** y el **RSD** de recuperación cumplen como criterio aceptable, el desempeño del método es aceptable. Si la **media** o **RSD** cae fuera del rango de recuperación, el desempeño del sistema es inaceptable para lo cual es necesario realizar una revisión de los pasos del método desde el inicio hasta el final, corregir el problema y repetir el ensayo para determinar el IPR.

3.2 Índice de Precisión y Recuperación en el tiempo (OPR): Se debe realizar cada 20 muestras analizadas independientemente del tipo de agua o mínimo una vez al año, lo que ocurra primero, con el fin de alimentar el proceso de aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo. La metodología para realizar y calcular el índice es la misma descrita para el IPR. Para cada parasito se calcula el porcentaje de recuperación (R) usando la siguiente ecuación:

$$R = 100 \times (N/T)$$

R= porcentaje de recuperación
N= número contado de ooquistes y quistes
T= número de ooquistes y quistes adicionados

3.3 Matrix Spike y Duplicado de Matrix Spike: Se debe procesar una muestra que corresponda al tipo de agua a analizar sin contaminación con los quistes y ooquistes de los parásitos, para determinar el efecto de la matriz o tipo de agua en la recuperación de estos y se debe verificar la recuperación cada 20 muestras o mínimo una vez al año, lo que ocurra primero. El duplicado solamente se realizará para efectos de cambios en algún componente significativo del método. Para cada parasito se calcula el porcentaje de recuperación (R) usando la siguiente ecuación.

$$R = 100 \times (N_{sp} - N_s) / T$$

R: porcentaje de recuperación

N_{sp}: número contado de ooquistes y quistes en la muestra contaminada

N_s: número contado de ooquistes y quistes en la muestra no contaminada

T: valor total de ooquistes y quistes en la muestra.

Los criterios de aceptación se referencian en las siguientes tablas:

Tabla 2. Criterios de aceptación del Control de Calidad para *Cryptosporidium*

PRUEBA	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Precisión y recuperación inicial (IPR)	
Porcentaje de Recuperación media	38 – 100
Precisión	37
Precisión y recuperación en curso (OPR)	33 - 100
Matrix Spike	
Porcentaje de Recuperación Media	32 – 100
Precisión	46

Fuente: Método EPA 1623.1 versión 2012

Tabla 3. Criterios de aceptación del Control de Calidad para *Giardia*

PRUEBA	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Precisión y recuperación inicial (IPR)	
Porcentaje de Recuperación media	27 – 100
Precisión	39
Precisión y recuperación en curso (OPR)	22 - 100
Matrix Spike	
Porcentaje de Recuperación Media	8 – 100
Precisión	97

Fuente: Método EPA 1623 .1 versión 2012

Como se evidencia, este es un control de calidad interno, el cual debe ser ejecutado por cada laboratorio con el fin de demostrar su capacidad diagnóstica. Actualmente el Grupo de Parasitología, no cuenta con la participación en un Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEED).

4 VIGILANCIA POR LABORATORIO DE *Giardia* y *Cryptosporidium*

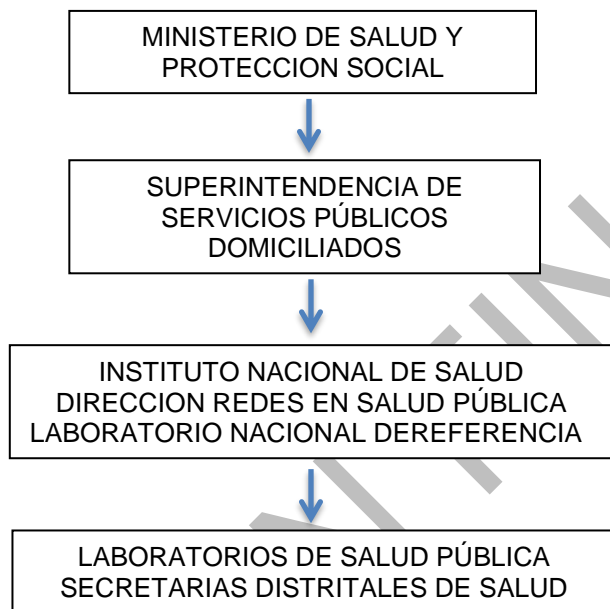
La vigilancia por laboratorio de *Giardia* y *Cryptosporidium*, consiste en identificar y describir su circulación mediante variables relacionadas con el tipo de agua analizada, estacionalidad y sitios donde circula. Con el fin de suministrar información que permita orientar las acciones de prevención primaria y secundaria; así como estrategias de control, intervención y seguimiento. De igual manera, se definirán indicadores que permitirán resumir y publicar en forma periódica informes técnicos y repositorios institucionales de microdatos y permitir su uso por parte de la comunicad científica, académica y administrativa del sistema de salud y el público en general.

Aunque las infecciones intestinales ocasionadas por estos parásitos son generalmente asintomáticas, estas han llegado a ocasionar brotes con importantes números de casos de morbilidad y mortalidad, principalmente en pacientes inmunocomprometidos, niños y adultos mayores. En esta población la infección gastrointestinal puede conllevar a síndrome de mala absorción, por lo que en el caso de los infantes se ve afectado el crecimiento y el desarrollo intelectual. A nivel Nacional, se cuenta con una serie de estamentos legislativos relacionados con la calidad del agua, responsabilidades y actividades a desarrollar (Tabla 4).

Tabla 4. Legislación Colombiana relacionada con la calidad del agua, actividades y responsabilidades de los actores

LEGISLACIÓN	GENERALIDAD
Decreto 1575 de mayo 09 de 2007	Por el cual se establece el sistema para la protección y control de la calidad del agua para consumo humano
Resolución 2115 de junio 22 de 2007	Por medio del cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano
Resolución 4716 de noviembre 18 de 2010	Mediante el cual se establecen las condiciones para elaborar los mapas de riesgo la calidad del agua para consumo humano
Resolución 0811 de marzo 5 de 2008	Por medio del cual se definen los lineamientos a partir de los cuales la autoridad sanitaria y las personas prestadoras, concertadamente definirán en su área de influencia los lugares y puntos de muestreo para el control y la vigilancia de la calidad del agua para consumo humano en la red de distribución
Resolución 1618 de 2010 (Derogada actualmente)	Establecer las características físicas, químicas y microbiológicas con los valores aceptables que debe cumplir el agua contenida en estanques de piscinas y estructuras similares de recirculación, la frecuencia de control y vigilancia de la calidad del agua que debe realizar el responsable y la autoridad sanitaria, así como el instrumento básico de la calidad de esta

5 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE *Giardia* Y *Cryptosporidium* EN MUESTRAS DE AGUA



5.1 Ministerio de Salud y Protección Social: Según el Artículo 5º del decreto 1775 de 2007- Los Ministerios de la Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, en cumplimiento de las funciones a su cargo, adelantarán de manera coordinada las siguientes acciones:

- Reglamentar todos los aspectos concernientes a la definición de las características físicas, químicas y microbiológicas del agua para el consumo humano.
- Diseñar los modelos conceptuales, técnicos y operativos y de protocolos que sean requeridos para el control y vigilancia para garantizar la calidad del agua para consumo humano.
- Diseñar la guía de criterios y actividades mínimas que deben contener los estudios de riesgo, programas de reducción de riesgos y los planes de contingencia.
- Evaluar los resultados de la implementación de las disposiciones del presente decreto por parte de las autoridades competentes.

5.2 Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios: Según el Artículo 6º del Decreto 1775 de 2007 y de conformidad con lo previsto en los artículos 79 modificado por el artículo 13 de la Ley 689 de 2001 y 81 de la Ley 142 de 1994 y demás normas concordantes, la Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios será “La autoridad competente para iniciar las investigaciones administrativas e imponer las sanciones a que haya lugar a las personas prestadoras que suministren o distribuyan agua para consumo humano por incumplimiento de las disposiciones del presente decreto y en los actos administrativos que lo desarrollen, sin perjuicio de la competencia de la autoridad sanitaria en dicha materia”.

5.3 Instituto Nacional de Salud: Según el Artículo 7º del decreto 1775 de 2007- en cumplimiento de las funciones a su cargo, el Instituto Nacional de Salud, cumplirá con las siguientes acciones: Hoja 5 de 14 Decreto 1575 DE 2006, Por el cual se establece el Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua para Consumo Humano:

- Coordinará la Red Nacional de Laboratorios para el Control y la Vigilancia de la Calidad del Agua para Consumo Humano y dará orientaciones y directrices en esta área a los laboratorios que realicen o presten el servicio de los análisis físicos, químicos y microbiológicos, establecidos en el presente decreto.
- Establecerá los requisitos necesarios para la realización de la validación o revalidación de métodos analíticos, que se comercialicen en el mercado o nuevas tecnologías introducidas, solicitados por las entidades que lo requieran. Los métodos validados o revalidados por el Instituto Nacional de Salud serán adoptados por el Ministerio de la Protección Social mediante acto administrativo, los cuales serán publicados cuando así se proceda.
- Realizará revisiones aleatorias de las metodologías analíticas validadas por los laboratorios que las aplican al análisis del agua para consumo humano. Estas metodologías deberán ser validadas, revalidadas y estandarizadas en las instalaciones de trabajo del laboratorio, para lo cual deben determinar atributos del método tales como: límite de detección, límite de cuantificación, reproducibilidad (precisión), exactitud (porcentaje de recuperación), incertidumbre, linealidad (rango dinámico lineal), reporte de interferencias, etc.
- Realizará y actualizará el manual de instrucciones que deben utilizar la autoridad sanitaria y las personas prestadoras, para la toma, preservación y transporte de muestras de agua para consumo humano para determinar su calidad física, química y microbiológica.
- Coordinará el Programa Interlaboratorio de Control de Calidad del Agua Potable – PICCAP.
- Realizará inscripción en el Programa Interlaboratorio de Control de Calidad para Agua Potable – PICCAP -, a los laboratorios de la Red de Salud Pública y los privados nacionales o extranjeros que realicen análisis físicos, químicos o microbiológicos de agua para consumo humano que lo soliciten.



5.4 Laboratorios de Salud Pública (LSP) y del Distrito Capital: Según el Artículo 8º del decreto 1775 de 2007, Artículo 8º. Las direcciones territoriales de salud como autoridades sanitarias de los departamentos, distritos y municipios, ejercerán la vigilancia sobre la calidad del agua para consumo humano. Para ello desarrollarán las siguientes acciones:

- Consolidar y registrar en el sistema de registro de vigilancia de calidad del agua para consumo humano los resultados de los análisis de las muestras de agua para consumo humano exigidas en el presente decreto, de acuerdo con los lineamientos que para el efecto expida el Ministerio de la Protección Social.
- Correlacionar la información recolectada del control y vigilancia de la calidad del agua para consumo humano con la información de morbilidad y mortalidad asociada a la misma y determinar el posible origen de los brotes o casos reportados en las direcciones territoriales de salud, de conformidad con lo establecido en el Decreto 3518 de 2006 sobre vigilancia en salud pública o la norma que la modifique, adicione o sustituya.
- Realizar la supervisión a los sistemas de autocontrol de las personas prestadoras de acuerdo con los protocolos que definan los Ministerios de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y de la Protección Social.
- Practicar visitas de inspección sanitaria a los sistemas de suministro de agua para consumo humano, con la periodicidad requerida conforme al riesgo. De cada visita se diligenciará el formulario único de acta, que para su efecto expedirá el Ministerio de la Protección Social, en la cual quede constancia del cumplimiento de las Buenas Prácticas Sanitarias encontradas en el sistema de suministro de agua para consumo humano objeto de la inspección.
- Realizar la vigilancia de las características físicas, químicas y microbiológicas del agua, como también de las características adicionales definidas en el mapa de riesgo, tanto en la red de distribución como en otros medios de suministro de la misma, según se establezca en la reglamentación del presente decreto.
- Velar por el cumplimiento de la franja de seguridad para la aplicación de plaguicidas en las cuencas que abastecen los acueductos municipales, de conformidad con lo establecido en el Decreto 1843 de 1991 o la norma que lo modifique, adicione o sustituya, mediante el cual se regula el uso y manejo de los plaguicidas, en coordinación con las Autoridades Ambientales y las personas prestadoras que suministran o distribuyen agua para consumo humano.
- Calcular los Índices de Riesgo de Calidad de Agua para Consumo Humano – IRCA’s y reportar los datos básicos del Índice de Riesgo Municipal por Abastecimiento de Agua para Consumo Humano – IRABAm, al Subsistema de Calidad de Agua Potable - SIVICAP de su jurisdicción, teniendo en cuenta la información recolectada en la acción de vigilancia, de acuerdo con las frecuencias que para tal efecto se establezcan.
- Expedir, a solicitud del interesado, la certificación sanitaria de la calidad del agua para consumo humano en su jurisdicción, para el período establecido en la solicitud.
- Las autoridades sanitarias municipales categorías 1, 2 y 3, deben coordinar las acciones de vigilancia del agua para consumo humano con la autoridad sanitaria departamental de su jurisdicción. Así mismo, deberán suministrar a la autoridad sanitaria departamental de su jurisdicción, para su consolidación y registro, los resultados de la calidad de agua, de los índices de riesgo de calidad y por



abastecimiento de agua y actas de visita de inspección sanitaria a los sistemas de suministro de agua para consumo humano de su competencia.

- Realizar inspección, vigilancia y control a los laboratorios que realizan análisis físicos, químicos y microbiológicos al agua para consumo humano. PARÁGRAFO 2. Los laboratorios de salud pública podrán prestar servicios de análisis a otras personas naturales, jurídicas, públicas o privadas mediante contratos o pagos por análisis efectuados, siempre y cuando no interfiera con las labores asignadas de vigilancia y control a los sistemas de suministro de agua para consumo humano.

5.5 Prestadores de servicio: Según el Artículo 9º del Decreto 1775 de 2007, las personas prestadoras que suministran o distribuyen agua para consumo humano, en relación con el control sobre la calidad del agua para consumo humano, deberán cumplir las siguientes acciones:

- Realizar el control de las características físicas, químicas y microbiológicas del agua para consumo humano, como también de las características adicionales definidas en el mapa de riesgo o lo exigido por la autoridad sanitaria de la jurisdicción, según se establezca en la reglamentación del presente decreto, para garantizar la calidad del agua para consumo humano en cualquiera de los puntos que conforman el sistema de suministro y en toda época del año.
- Lavar y desinfectar antes de la puesta en funcionamiento y como mínimo dos (2) veces al año, los tanques de almacenamiento de aguas tratadas.
- Lavar y desinfectar, antes de ponerlos en operación y cada vez que se efectúen reparaciones en ellos, los pozos profundos y excavados a mano para captación de agua subterránea, las estructuras de potabilización y las tuberías de distribución de agua para consumo humano.
- Drenar periódicamente en aquellos puntos de la red de distribución que representen zonas muertas o de baja presión.
- Cuando la persona prestadora que suministra o distribuye agua para consumo humano preste el servicio a través de medios alternos como son carrotanques, pilas públicas y otros, se debe realizar el control de las características físicas, químicas y microbiológicas del agua; como también de las características adicionales definidas en el mapa de riesgo o lo exigido por la autoridad sanitaria de la jurisdicción, según se establezca en la reglamentación del presente decreto.

5.6 Usuarios: Según el Artículo 10º del Decreto 1775 de 2007, Todo usuario es responsable de mantener en condiciones sanitarias adecuadas las instalaciones de distribución y almacenamiento de agua para consumo humano a nivel intradomiciliario, para lo cual, se tendrán en cuenta, además, los siguientes aspectos:

- Lavar y desinfectar sus tanques de almacenamiento y redes, como mínimo cada seis (6) meses.
- Mantener en adecuadas condiciones de operación la acometida y las redes internas domiciliarias para preservar la calidad del agua suministrada y de esta manera, ayudar a evitar problemas de salud pública.
- En edificios públicos y privados, conjuntos habitacionales, fábricas de alimentos, hospitales, hoteles, colegios, cárceles y demás edificaciones que conglomeren

individuos, los responsables del mantenimiento y conservación locativa deberán realizar el lavado y desinfección de los tanques de almacenamiento de agua para consumo humano, como mínimo cada seis (6) meses. La autoridad sanitaria podrá realizar inspección cuando lo considere pertinente.

NOTA: Parágrafo. Las autoridades sanitarias departamentales, distritales y municipales, las personas prestadoras que suministran o distribuyen agua para consumo humano y las autoridades ambientales, se encargarán dentro de sus campañas de educación sanitaria y ambiental, de divulgar ampliamente entre la población las obligaciones que tienen como usuario, así como las orientaciones para preservar la calidad del agua para consumo humano y hacer buen uso de ella al interior de la vivienda.

VERSIÓN FINAL

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Botero, D., & Restrepo, M. (2012). *Parasitosis humanas: Incluye animales venenosos y ponzonosos*. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).
- Clavel, A., Arnal, A. C., Sánchez, E. C., Cuesta, J., Letona, S., Amiguet, J. A., ... Gómez-Lus, R. (1996). Respiratory cryptosporidiosis: case series and review of the literature. *Infection*, 24(5), 341–346.
- DuPont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B., & Jakubowski, W. (1995). The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers. *New England Journal of Medicine*, 332(13), 855–859. <https://doi.org/10.1056/NEJM199503303321304>
- Ensink, J. H. J., van der Hoek, W., & Amerasinghe, F. P. (2006). Giardia duodenalis infection and wastewater irrigation in Pakistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(6), 538–542. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.08.014>
- Fayer, R., & Ungar, B. L. (1986). Cryptosporidium spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews*, 50(4), 458–483.
- Gallas-Lindemann, C., Sotiriadou, I., Plutzer, J., Noack, M. J., Mahmoudi, M. R., & Karanis, P. (2016). Giardia and Cryptosporidium spp. dissemination during wastewater treatment and comparative detection via immunofluorescence assay (IFA), nested polymerase chain reaction (nested PCR) and loop mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Tropica*, 158, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.02.005>
- Juranek, D. D. (1995). Cryptosporidiosis: sources of infection and guidelines for prevention. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 21 Suppl 1, S57–S61.
- Kohli, A., Bushen, O. Y., Pinkerton, R. C., Houpt, E., Newman, R. D., Sears, C. L., ... Guerrant, R. L. (2008). Giardia duodenalis assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(7), 718–725. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.002>
- Lengerich, E. J., Addiss, D. G., Marx, J. J., Ungar, B. L., & Juranek, D. D. (1993). Increased exposure to cryptosporidia among dairy farmers in Wisconsin. *The Journal of Infectious Diseases*, 167(5), 1252–1255.
- Mohammed Mahdy, A. K., Lim, Y. A. L., Surin, J., Wan, K. L., & Al-Mekhlafi, M. S. H. (2008). Risk factors for endemic giardiasis: highlighting the possible association of contaminated water and food. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(5), 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.02.004>
- Núñez, F. Á., López, J. L., de la Cruz, A. M., & Finlay, C. M. (2003). Factores de riesgo de la infección por Giardia lamblia en niños de guarderías infantiles de Ciudad de La Habana, Cuba. *Cadernos de Saúde Pública*, 19(2), 677–682. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2003000200036>
- Ravid, Z., Duque, S., Arévalo, A., Nicholls, R. S., & Wasserman, M. (2007). Genetic diversity of Giardia intestinalis populations in Colombia. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud*, 27(1), 34–41. <https://doi.org/S0120-41572007000100004>
- Shields, J. M., Gleim, E. R., & Beach, M. J. (2008). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia intestinalis* in Swimming Pools, Atlanta, Georgia. *Emerging Infectious Diseases*, 14(6), 948–950. <https://doi.org/10.3201/eid1406.071495>
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., & Upton, S. J. (2004). Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 72–97.