

# **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.**

**Presencia y Estimación de Riesgo de  
*Cryptosporidium* y *Giardia*, en Agua de Mar de  
Playas del Estado de Sinaloa**

Por:

**Dalia Magaña Ordorica**

TESIS APROBADA POR LA

**UNIDAD CULIACÁN EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE PRODUCTOS  
AGRÍCOLAS PARA ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES**

**Como requisito parcial para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

Culiacán, Sinaloa

Diciembre de 2000

## DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director o directora de tesis.

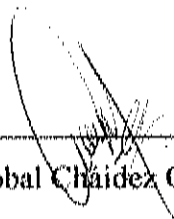
---

**Dr. Alfonso Gardea Bejar**

Director General

## APROBACIÓN

Los miembros del comité asignado para revisar la tesis de Dalia Magaña Ordorica, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



---

Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz


Director de tesis



---

Dra. Josefina León Félix

Asesor



---

Dr. José Benigno Valdez Torres

Asesor



---

M.C. Soila Maribel Gaxiola Camacho

Asesor

*“Si he conseguido ver más lejos, es porque me he aupado en hombros de gigantes. No se lo que pareceré a los ojos del mundo, pero a los niños es como si hubiese sido un niño que juega en la orilla del mar y se divierte de tanto en tanto encontrando un guijarro más pulido o una concha más hermosa, mientras el inmenso océano de la verdad se extendía, inexplorado frente a mí”.*

*Isaac Newton*

## DEDICATORIA

*A mis padres José Guadalupe Magaña Canchola y Dalia Guadalupe Ordorica Falomir, quienes me han enseñado que Dios es mi fortaleza, por enseñarme el respeto y el amor a la vida, por formar en mí el deseo de superación y confiar en mí a cada paso que doy, gracias por todo su apoyo y todo su amor, los amo y que Dios los bendiga.*

*A mis hermanos, Jackeline, Lizeth, Juan José y Saulo, quienes confían en mí y hacen de mi familia el mejor lugar para emprender el camino, que Dios los bendiga.*

*A mis abuelos, Abelardo Ordorica Escobar, en su memoria, por tantas historias compartidas y por los buenos recuerdos y Manuela Falomir Castro que con su amor y oraciones contribuyen en mis logros.*

*A mi compañero y amigo, de momentos a veces difíciles y en los buenos momentos, que seguro vendrán más, donde he recibido su apoyo y amor, gracias por todo, Miguel.*

## AGRADECIMENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haber permitido a través de su beca económica la realización de mis estudios de postgrado.
- Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad Culiacán, por las facilidades otorgadas para el ingreso al programa de Maestría en Ciencias.
- Al Dr. Cristóbal Cháidez Quiroz por compartir sus conocimientos y experiencias en esta etapa de mi formación profesional, su dedicación, confianza y sobre todo su apoyo y amistad.
- A la Dra. Josefina León Félix, por contribuir con sus conocimientos a la realización de este proyecto, su apoyo y confianza.
- Al Dr. José Benigno Valdez Torres, por su valiosa asesoría en el área estadística, su paciencia y su enorme capacidad de transmitir sus conocimientos y su calidad humana.
- A la Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho, por compartir sus conocimientos y proporcionar medios para la realización del proyecto.
- A mis profesores de Maestría, Dr. Jorge H. Siller Cepeda, Dr. Tomás Osuna Enciso, Dr. Miguel Ángel Ángulo Escalante, Dr. Raymundo García Estrada, MC. Armando Carrillo Fasio, Dra. Maria Dolores Muy Rangel y MC. Manuel Báez Sañudo.

- A MC. Johana Marcela Soto Beltrán, por ser mi asesora interna de laboratorio y transmitir sus conocimientos y experiencias, que me propiciaron un mejor desempeño como investigador y sobre todo su amistad y confianza.
- A QFB. Célida Isabel Martínez Rodríguez, por su apoyo técnico en el laboratorio, que permitieron la organización y realización de este proyecto, su apoyo incondicional, comprensión y amistad.
- A mis compañeros de Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos, QFB. José Andrés Medrano Félix, Néstor A. Gallardo Zazueta, Miriam Belén Vega Rodríguez, María de la Paz Sosa Segura, quienes me ayudaron en los muestreos y fueron compañeros y amigos de arduas labores.
- A MC. Yadira López Pantoja, por su apoyo, disponibilidad y amistad.
- Al IA. Isidro Márquez y al IA. Luis Pérez, por su apoyo incondicional y facilitarme algunos de los materiales necesarios en la realización de este proyecto, su amable compañía y amistad.
- A MC. Verónica Pérez Rubio, MC. Eduardo Sánchez, por disponibilidad y apoyo.
- Al IQ. Werner Rubio Carrasco, por sus asesorías que me ayudaron a obtener fáciles respuestas, pero sobre todo por su amistad.
- A IBQ. Evelia Araiza Lizarde, por su disponibilidad y atención en el área administrativa y su grata amistad.
- A MC. Rosabel Vélez de la Rocha, por ser mi asesora adjunta de laboratorio y proporcionarme los medios y materiales para la realización de este trabajo, y sin lugar a duda su amistad.

- MC. Laura A. Contreras Ángulo y MC. Adriana Sañudo Barajas, por sus buenos comentarios y aportaciones en la exposición de mi trabajo, su confianza y amistad.
- A Víctor Arana, por su amistad y compartir conmigo momentos muy agradables, que de mucho ayudaron a tener mis momentos de relajación.
- A QFB. Pedro Bastidas, QFB. Jesús Héctor Carrillo, TLQ. Claudia Olmeda y QFB. Alma Lorena Barraza, por ser buenos compañeros de trabajo y su amable compañía.
- Al área administrativa, LCPF. Mayra Ibarra, CP. Xiomara L. Urrea, y Lic. Arnulfo Osuna por su disponibilidad y atención.
- Al personal del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria, de la Universidad Autónoma de Sinaloa.
- A mis compañeros de Maestría de la generación 2004-2006 por su amistad y apoyo que hicieron de mí una mejor persona, muchas gracias¡¡ Iris, Marina, Yuridia, Elizabeth, Vania, Blanca, Edith, Hilario e Iván, hasta siempre.



## CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo General.....	8
Objetivos Particulares.....	8
HIPÓTESIS.....	9
METAS.....	10
REVISION DE LITERATURA.....	11
Descripción del Problema.....	11
Calidad del Agua de Mar.....	12
Importancia de la Calidad del Agua de Mar.....	18
Factores que Afectan la Calidad del Agua de Mar.....	19
Microorganismos Patógenos Presentes en Agua de Mar.....	21
Factores que Afectan la Presencia de Microorganismos en el Agua.....	22

Protozoarios.....	23
<i>Cryptosporidium</i> spp. ....	25
Morfología.....	26
Taxonomía.....	26
Ciclo de vida.....	29
Patogenicidad.....	32
Enfermedad.....	32
Prevalencia y brotes.....	34
Resistencia de los ooquistes.....	35
<i>Giardia</i> spp. ....	36
Morfología.....	37
Taxonomía.....	38
Ciclo de vida.....	39
Patogenicidad.....	41
Enfermedad.....	42
Prevalencia y brotes.....	43
Resistencia de los quistes.....	44
Asociación de <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> en Agua.....	45
Métodos de Detección en el Ambiente.....	48
Técnicas de Concentración con Filtros (Filtración).....	48

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	51
Separación Inmunomagnética.....	54
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>56</b>
Presencia de Protozoarios.....	56
Selección de los puntos de muestreo.....	56
Descripción de los puntos de muestreo.....	57
Procedimiento de muestreo de agua de mar.....	59
Determinación de parámetros fisicoquímicos.....	59
Potencial de hidrógeno.....	59
Temperatura.....	60
Turbidez.....	60
Salinidad.....	60
Filtración.....	60
Elución de la cápsula.....	61
Purificación de la muestra (IMS).....	62
Tinción (Inmunofluorescencia).....	64
Microscopía.....	65
Reporte de resultados.....	65
Eficiencia de Recuperación del Método 1623.....	66
Ooquistes de <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	66

Quistes de <i>Giardia lamblia</i> .....	67
Confirmación de las Muestras por PCR.....	68
Extracción de DNA.....	68
Muestras Positivas para <i>Cryptosporidium</i> spp. por PCR.....	70
Muestras Positivas para <i>Giardia</i> spp. por PCR.....	72
Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	74
DISEÑO ESTADÍSTICO.....	76
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
Presencia de Protozoarios.....	80
Modelo de Regresión Logística (Predicción de Riesgos).....	99
Predicción de riesgo para <i>Cryptosporidium</i> .....	99
Predicción de riesgo para <i>Giardia</i> .....	107
Confirmación de las Muestras por PCR.....	114
CONCLUSIONES.....	119
SUGERENCIAS.....	121
LITERATURA CITADA.....	123
ANEXOS.....	138

## LISTA DE CUADROS

Cuadros	Página
1. Estándares para la Evaluación Microbiológica de Aguas Recreativas.....	15
2. Criterios de Clasificación de Playas.....	17
3. Nombre de las Especies y Hospederos Asociados a <i>Cryptosporidium</i> .....	27
4. Nombre de las Especies de <i>Giardia</i> y Hospederos.....	39
5. Puntos de Muestro.....	56
6. Primers para Confirmación de <i>Cryptosporidium</i> spp. por PCR.....	71
7. Mezcla Madre de PCR para Primers Cphsp 2423 y Cphsp 2764.....	71
8. Condiciones de Amplificación del Gen <i>hsp 70</i> de un Tamaño de 361 pb.....	72
9. Primers para Confirmación de <i>Giardia</i> spp. por PCR.....	73
10. Mezcla Madre de PCR para Primers GGR y GGL.....	73
11. Condiciones de Amplificación del Gen <i>giardina</i> de un Tamaño de 171 pb..	74
12. Porcentaje de Muestras que Contienen Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> y Quistes de <i>Giardia</i> .....	82
13. Rango y Promedio de Muestras Positivas para <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> .	82
14. Concentración Promedio de Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> /10L y Quistes de <i>Giardia</i> /10L, en las Muestras de la Bahía de Altata.....	89
15. Concentración Promedio de Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> /10L y Quistes	

de <i>Giardia</i> /10L, en Muestras de Mazatlán.....	92
16. Calidad del Agua en los Puntos de Muestreo.....	98
17. Análisis Logístico para la Presencia de Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> .....	99
18. Predicción de Riesgos de Presencia de Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> .....	106
19. Análisis Logístico para la Presencia de Quistes de <i>Giardia</i> .....	107
20. Predicción de Riesgos de Presencia de Quistes de <i>Giardia</i> .....	112

## LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Ciclo Biológico de <i>Cryptosporidium parvum</i> (CDC, 2005a).....	31
2. Ciclo Biológico de <i>Giardia lamblia</i> (CDC, 2005b).....	41
3. Función Logística.....	76
4. Porcentaje de Muestras que Contienen Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> y Quistes de <i>Giardia</i> en la Bahía de Altata.....	84
5. Porcentaje de Muestras Positivas para Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> y Quistes de <i>Giardia</i> en Mazatlán.....	85
6. Presencia de Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> en la Bahía de Altata.....	90
7. Presencia de Quistes de <i>Giardia</i> en la Bahía de Altata.....	91
8. Presencia de Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> en Mazatlán.....	93
9. Presencia de Quistes de <i>Giardia</i> en Mazatlán.....	94
10. Gel de Electroforesis al 1% para <i>Cryptosporidium</i> spp.....	114
11. Gel de Electroforesis al 1% para <i>Giardia</i> spp.....	116

## RESUMEN

El agua de mar utilizada para propósitos recreativos debe estar libre de contaminación microbiológica, física y química. El agua de mar puede contener una mezcla de microorganismos patógenos, la cual proviene de numerosas fuentes, que incluyen, las descargas de aguas residuales, y de ríos, que transportan heces de humanos y animales. Para asegurar la calidad del agua de mar se han establecido estándares microbiológicos donde se emplean microorganismos indicadores, sin embargo, éstos no evidencian la presencia directa de algunos patógenos como protozoarios y virus.

El monitoreo de *Cryptosporidium* y *Giardia*, que en concentraciones bajas, pueden ser causa de gastroenteritis severas, proporciona información sobre el riesgo de infección por la ingesta accidental del agua contaminada, durante actividades recreativas. Diversos métodos se han utilizado para la detección y cuantificación de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua, en algunos la baja capacidad de recuperación, procesos largos y costosos, son algunas de sus limitantes y los resultados pueden ser difíciles de interpretar. El método 1623 aprobado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2001) para la detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua, es una metodología que asegura un buen porcentaje de recuperación.

El objetivo del presente trabajo fue predecir el riesgo microbiológico mediante el análisis de regresión logística binaria, de *Cryptosporidium* y *Giardia* presentes en agua de mar, detectada y cuantificados por el método 1623, en playas del estado de Sinaloa, con base a los factores fisicoquímicos evaluados.



de ml, detectados y cuantificados por el método 1623, en las playas del estado de Sinaloa, con base en los factores fisicoquímicos evaluados,

Se analizaron un total de 32 muestras de agua de mar, 14 muestras de dos zonas de la Bahía de Altata y 18 muestras en tres zonas en Mazatlán. Las muestras se procesaron por filtración, separación inmunofluorescente e inmunofluorescencia de acuerdo al método 1623 y se midieron los parámetros fisicoquímicos pH, temperatura, salinidad y turbidez.

Los resultados muestran la presencia de oocistos de *Giardia lamblia* en un 78.57% (11/14) de las muestras analizadas de la Bahía de Altata y un 57.14% (8/14) en la presencia de quistes de *Giardia*. En Mazatlán, se encontró la presencia de oocistos de *Giardia lamblia* en un 83.3% (15/18) de las muestras analizadas y un 72.22% (13/18) de quistes de *Giardia*. El rango de oocistos detectados en las muestras positivas fue de 150-2050 oocistos/100L con una media de 593.75 oocistos/100L (SD 654.48) y el rango de concentración de quistes de *Giardia* fue de 10-300 quistes/100L con una media de 71.75 quistes/100L (SD 75.89).

En la Zona II, de la Bahía de Altata, se observó la mayor contaminación por la presencia de ambos protozoarios (81.14%) y la Zona I de Mazatlán se observó mayor contaminación de ambos protozoarios (83.33%). Se observó mayor concentración de oocistos durante las estaciones de otoño-invierno y primavera.

La temperatura mostró efecto significativo en el riesgo de presencia de oocistos de *Giardia lamblia* y *Giardia*, al estimar que existe mayor riesgo de que

estos se encuentren presentes a temperaturas bajas. La turbidez fue incluido en el análisis de riesgo de presencia/ausencia de *Cryptosporidium*, y se observó que a mayor turbidez mayor riesgo de presencia/ausencia de *Cryptosporidium*. La salinidad no mostró efecto significativo en el riesgo de presencia/ausencia de *Cryptosporidium*. La turbidez mostró efecto significativo en la presencia/ausencia de quistes de *Giardia*, por lo que, existe mayor riesgo de que éstos se encuentren presentes a niveles de turbidez mayores, como 5 NTU que a 2 NTU. La salinidad mostró nula significancia en el riesgo de presencia/ausencia de quistes de *Giardia*.

Los resultados indican la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en el agua de mar de las playas evaluadas del estado de Sonora, y las conclusiones obtenidas indican que la dosis infecciosa estimada para ambos protozoos, lo cual representa un riesgo a la salud de los usuarios de aguas recreativas.

Por lo que, es importante que se establezcan programas de monitoreo, no sólo de microorganismos indicadores en la evaluación de la calidad microbiológica de las playas, sino también, el monitoreo de microorganismos patógenos como *Cryptosporidium* y *Giardia*, que permitan prevenir riesgos a la salud y mantener la seguridad de las playas recreativas del estado.

## ABSTRACT

Recreational beaches must be free of microbiological, physical and chemical contamination. The seawater may contain a mixture of pathogenic microorganisms, the wastewater and rivers may also; might transport fecal matter from humans and animals sources to recreational beaches. Bacterial indicators have been established for evaluating beach water quality, however indicators microorganisms do not predict the direct presence of protozoans and viruses.

The detection of environmental resistant protozoans of Cryptosporidium and Giardia, that can be cause of severe gastroenteritis, provides information on the risk of infection, due to the accidental ingestion of contaminated seawater. Diverse methods used for the detection of Cryptosporidium and Giardia have been reported, in some the low capacity of recovery, long and expensive processes. In some of the limitations. Method 1623, approved by the Environmental Protection Agency of the United States (EPA, 2001), for the detection of Cryptosporidium and Giardia in water, provides a good percentage of recovery.

The objective of this present work was predict the microbial risk by logistic regression analysis of Cryptosporidium and Giardia present in seawater, identified and quantify by method 1623, in beaches of state of Sinaloa, with base to the physicochemical parameters evaluated,

A total of 32 seawater samples was collected, 11 were obtained from two zones of the Ahata Bay and 18 from three zones in Mazatlán. Samples were processed by filtration, immunomagnetic separation and immunofluorescence according to method 1623. Physicochemical parameters pH, temperature, salinity and turbidity, were analyzed.

The results showed the presence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in 78.57% (11/14) and 57.14% (8/14) respectively, of the samples obtained from Ahata Bay. In Mazatlán, the presence of *Cryptosporidium* was detected in the 83.33% (15/18) and *Giardia* in 72.22% (13/18), of the samples. The concentration range of *Cryptosporidium* oocyst detected was 150-2050 oocysts/L with an average of 593.75 oocysts/L (SD 65.48) and the concentration range of *Giardia* cysts was 10-300 cysts/L with an average of 77.75 cysts/L (SD 75.89).

Zone II, in the Ahata Bay, presented high contamination by both protozoans (51, 14%) and at Zone I, in Mazatlán, presented high contamination by the presence of both protozoans (83,33%). Was observed greater concentration of oocysts during summer-winter and spring.

The risk prediction results showed that as the water temperature decreases the risk of protozoans parasites presence increases. The turbidity was included in the analysis of risk prediction of *Cryptosporidium* and showed that when the level increase of turbidity the risk of presence increase. The salinity did not showed significant effect in the risk presence of *Cryptosporidium*. The turbidity showed significant effect in the

presence/absence of Giardia cysts, as the turbidity increases from 2 to 5 NTU the risk of Giardia presence increase, THJ salinity did not show significant effect in the risk of presence/absence of Giardia cysts.

These results indicate that *Escherichia coli* and Giardia are present in all the seawater of evaluated beaches from the state of Illinois. Both protozoans were present in concentration that might represent a health risk to the Inham. The risk of presence was associated to low temperature and high turbidity.

Continuous monitoring should be based not only on bacterial microorganisms, should be included pathogenic microorganisms such as *Escherichia coli* and Giardia, this will permit to prevent risk to health and increase the security of recreational beaches of this state.

## INTRODUCCION

La contaminación del agua, es un problema latente y recientemente, a cobrado importancia el estudio de la calidad microbiológica de las aguas de uso recreativo, las cuales se definen como, cualquier área costera, estuarina y agua dulce donde se practican actividades recreativas. Los usos recreativos incluyen actividades de contacto primario; como nadar, bucear, esquiar y actividades de contacto secundario; como pescar y navegar (OMS, 2003). En México, como en el resto del mundo, dentro del contexto socioeconómico el uso de aguas recreativas, principalmente las playas, son de gran impacto en el sector turístico. El turismo es de importancia considerable en términos de magnitud e impacto en los aspectos socioeconómico y ambiental. Cada año, millones de turistas se congregan en áreas costeras, convirtiendo a esta actividad como la tercer mayor industria del país y el principal aporte económico para estados costeros, sin embargo, esta actividad ha traído consigo un deterioro ambiental por efecto de la contaminación de las aguas costeras.

La contaminación de las playas tiene su origen en fenómenos naturales (mareas rojas, lluvias intensas, huracanes y cambios climáticos inesperados) y actividades humanas realizadas en la zona costera y continental (Bartram y Rees, 2000). El exceso de lluvia durante las tormentas afecta a las playas, debido al escurrimiento de materiales orgánicos, basura doméstica y otros desechos que desembocan en el mar. Así mismo,

existen otros contaminantes que llegan al mar proveniente de diversas actividades desarrolladas cerca de ríos, mares y lagunas. Entre estos, se encuentran el uso de fertilizantes y/o plaguicidas en zonas agrícolas, descargas de aguas residuales, y de residuos de granjas avícolas, porcícolas o acuícola, así como, residuos comestibles arrojados al mar por restauranteros, residuos de pescados y mariscos producto de las cooperativas pesqueras, desechos de barcos y otras embarcaciones menores (aceites o basura); residuos provenientes de actividades industriales y de ingenios azucareros cercanos a la costa. Todos estos contaminantes, se concentran en la zona de playas durante varios días, aumentando significativamente los riesgos a la salud de los usuarios que entran en contacto con el agua contaminada (Bartram y Rees, 2000; SEMARNAT, 2004).

Las aguas costeras de uso recreativo deben mantener una eficiente calidad física y microbiológica (Bartram y Rees, 2000). El agua contaminada pone en riesgo las diversas actividades turísticas y económicas realizadas en las zonas costeras, el aseguramiento de la calidad del agua puede proteger a los millones de visitantes en las playas y bahías y aumentar las diversas actividades económicas (NRDC, 2004). Los riesgos que se presentan en aguas recreativas varían de una región a otra, así como la naturaleza y tiempo de exposición. La existencia de un rango diverso de peligros indica la necesidad de conocer los riesgos de importancia para la salud. La deficiente calidad

microbiológica del agua se relaciona a infecciones adquiridas durante el baño o por la ingesta accidental de agua contaminada (Bartram y Rees, 2000; Yoder y col., 2004).

Las aguas de uso recreativo contienen una mezcla de microorganismos patógenos y no patógenos, que pueden provenir de numerosas fuentes. Las descargas de aguas residuales al mar, ya sea tratada y no tratada, al mar, pueden contener concentraciones importantes de parásitos patógenos transmitidos por el agua, tales como *Giardia* y *Cryptosporidium* (Johnson y col., 1995). En general, las infecciones y enfermedades asociadas con el contacto de aguas de uso recreativo se agrupan en dos categorías. La primera de ellas, es la gastroenteritis, asociada a microorganismos entéricos (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli* 0157:H7, Hepatitis A, Coxsackie A y B y virus Norwalk) que constituye la principal afectación asociada a la ingesta accidental de agua contaminada con heces (APHA, 1999; OMS, 2003). La segunda categoría de infecciones o enfermedades son las enfermedades respiratorias agudas y las enfermedades de la piel, asociadas con otros microorganismos como son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* sp., *Legionella* sp., *Naegleria fowleri*, *Mycobacterium* sp. y *Vibrio* sp. (APHA, 1999). Las enfermedades relacionadas con el baño son de baja severidad y solo en algunos casos pueden ocasionar la muerte, sin embargo, el bienestar de las personas se ve afectada debido a los costos médicos que éstas representan, lo cual también puede ocasionar pérdida de trabajo o ausentismo laboral (NRDC, 2004).



En el ámbito internacional y nacional, se han establecido estándares que orientan a los usuarios de las playas o sitios turísticos sobre las concentraciones de los contaminantes que más riesgo representan a la salud. En los últimos años, se ha puesto atención a la contaminación microbiológica de las aguas de mar cercanas a las playas y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2003, estableció estándares de calidad microbiológica de aguas costeras y de agua dulce de uso recreativo, las cuales se encuentran plasmados en las Guías para Ambientes Seguros de Aguas Recreativas (*Guidelines for Safe Recreational Water Environments*, Vol 1). Es a partir de este documento, que países como Estados Unidos, Canadá y países de la Comunidad Europea, establecieron regulaciones y guías para la calidad y uso de aguas recreativas de contacto primario (OMS, 2003). En México, en el 2003 se inició el Sistema Nacional de Información sobre la Calidad del Agua en Playas Mexicanas que tiene como objetivo evaluar la calidad de las playas con mayor afluencia turística en los 17 estados costeros del país, por lo que, se realizan monitoreos mensuales bajo los lineamientos establecidos por la OMS, para aguas de uso recreativo (SSA, 2004; OMS, 2003).

Los estándares de calidad microbiológica en aguas de uso recreativo se basan en la evaluación de microorganismos indicadores (*E. coli* y Enterococos) de contaminación fecal, humana y animal. La presencia de microorganismos indicadores tradicionalmente se han relacionado con riesgos a la salud (Bitton, 1994; Scott y col., 2002), sin embargo, estudios recientes han mostrado que los microorganismos indicadores, carecen

de impacto cuando se correlacionan con microorganismos como *Cryptosporidium* y *Giardia*, (Harwood y col., 2005). El monitoreo de microorganismos patógenos provee la evidencia directa de su presencia, sin embargo, muchos de ellos se encuentran en bajas concentraciones, por lo que su identificación puede ser complicada (Scott y col., 2002). Sin embargo, a pesar de estas complicaciones, la detección y cuantificación de patógenos, permite la estimación de riesgos (OMS, 2003).

*Cryptosporidium* y *Giardia* se han convertido en patógenos importantes presentes en el agua por tres razones: primero, la cryptosporidiosis y giardiasis son infecciones zoonóticas y antropónicas; segundo, las concentraciones en el ambiente con ooquistes y quistes son suficientes para que una persona se infecte, debido a sus bajas dosis infecciosas; tercero, los ooquistes y quistes son de tamaño pequeño que pueden resistir los tratamientos de desinfección del agua (Slifko y col., 2000). *Cryptosporidium* y *Giardia*, son protozoarios que poseen una estructura quística que los protege de condiciones ambientales adversas, los hace resistentes a la desecación, a la carencia de nutrientes, a altas temperaturas, a la escasez de oxígeno y a los procesos de desinfección en plantas de tratamiento de agua potable y residuales (Bitton, 1994; Marshall y col., 1997).

*Cryptosporidium* y *Giardia* se encuentran ampliamente distribuidos alrededor del mundo y se han detectado en aguas superficiales de ríos, lagos agua de uso agrícola y de consumo (LeChevallier y col., 1991a,b; Ono y col., 2001; Chaidez y col., 2005) y

algunos estudios han demostrado su presencia en aguas costeras y recreativas (Johnson y col., 1995; Mathieu y col., 2004), así como su presencia en diversos mariscos (Fayer y col., 1997, 1998a; Gomez-Bautista y col., 2000), y como causa de brotes epidemiológicos por contaminación del agua alrededor del mundo, asociadas a gastroenteritis por el consumo de agua contaminada principalmente, por descargas de aguas residuales (LeChevallier y col., 1991).

*Cryptosporidium* spp., es un protozooario zoonótico, que parasita el aparato digestivo del hombre y número importante de animales, su dosis mínima infecciosa es baja (10 ooquistes) (Tay, 1995). El ooquiste es la fase infectante, las principales rutas de transmisión de *Cryptosporidium* son la fecal-oral, persona a persona, animal-persona y debido a la ingestión de agua o alimentos contaminados (Bitton, 1994; Tay, 1995).

*Giardia* spp., es un protozooario zoonótico, que parasita el aparato digestivo del hombre y animales, la infección del huésped se inicia cuando los quistes son ingeridos a través de agua o alimentos contaminados. La dosis mínima infecciosa de *Giardia* es de 10 a 100 quistes (Bitton, 1994). El quiste es resistente a una variedad de condiciones ambientales adversas (Adam, 2001). Los animales salvajes y domésticos actúan como principales reservorios de quistes de *Giardia*. Además, las aguas residuales domésticas son una importante fuente de quistes.

Se han desarrollado diversos métodos para la detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua, en algunos la limitante es poseer baja capacidad de recuperación, ser

muy laboriosos y algunas ocasiones los resultados son difíciles de interpretar (Rose y col., 1989). Sin embargo, algunos de estos métodos combinan diversas técnicas que permiten un mayor porcentaje de recuperación de oo/quistes en el agua. El método 1623, de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2001) combina la filtración, separación inmunomagnética e inmunofluorescencia, para la detección y cuantificación de *Cryptosporidium* y *Giardia*, el cual ha sido ampliamente utilizado para el análisis de muestras de agua superficiales y aguas residuales (DiGorgio y col., 2002; Quintero-Betancourt y col., 2003; LeChevallier y col., 2003;).

En México, no se han reportado estudios que detecten la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua de mar. Debido a lo anterior, el objetivo de este estudio fue estimar el riesgo microbiológico mediante el análisis de regresión logística binaria, de *Cryptosporidium* y *Giardia* presentes en agua de mar, detectados y cuantificados por el método 1623, en playas del estado de Sinaloa, con base a los factores físicoquímicos evaluados.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Predecir el riesgo microbiológico de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* presentes en agua de mar de playas del estado de Sinaloa, con base a su relación con los factores físicoquímicos evaluados.

### Objetivos Particulares

1. Detectar ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en agua de mar en playas de la bahía de Altata y Mazatlán.
2. Cuantificar ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en agua de mar en playas de la bahía de Altata y Mazatlán.
3. Predecir el riesgo de presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en agua de mar por su relación con los factores físicoquímicos (temperatura, turbidez y salinidad).
4. Predecir el riesgo de presencia de quistes de *Giardia* en agua de mar por su relación con los factores físicoquímicos (temperatura, turbidez y salinidad).

## HIPÓTESIS

1. Existen ooquistes de *Cryptosporidium*, en agua de mar en las playas del estado de Sinaloa.
2. Existen quistes de *Giardia*, en agua de mar en las playas del estado de Sinaloa.
3. Al menos uno de los factores fisicoquímicos evaluados (temperatura, turbidez y salinidad) tiene efecto significativo en la probabilidad de presencia/ausencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en agua de mar.
4. Al menos uno de los factores fisicoquímicos evaluados (temperatura, turbidez y salinidad) tiene efecto significativo en la probabilidad de presencia/ausencia de quistes de *Giardia* en agua de mar.

## METAS

1. Obtener información relacionada con la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua de mar.
2. Dar a conocer que existe un riesgo a la salud de los usuarios de las playas al encontrar ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en agua de mar.
3. Proporcionar un modelo matemático que permite hacer predicciones sobre la presencia de los protozoarios evaluados bajo los diferentes factores físicoquímicos evaluados.

## REVISION DE LITERATURA

### Descripción del Problema

En México, no existe información relacionada con la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua de mar de uso recreativo. Estos protozoarios entéricos constituyen un riesgo para la salud de los usuarios de aguas recreativas. Los parámetros de calidad microbiológica internacionales y nacionales de agua de mar solo establecen estándares para microorganismos indicadores que no reflejan la presencia directa de microorganismos patógenos (OMS, 2003; SSA, 2004).

El agua de mar puede estar contaminada y servir como vehículo para diseminar microorganismos patógenos. La ingesta accidental de agua y el consumo de productos marinos, pueden ser la principal causa de enfermedades gastrointestinales reportadas en centros marítimos de recreo (Griffin y col., 2001). La falta de uniformidad en el monitoreo de agua de mar, se debe, en parte a la ausencia de acuerdos sobre el uso de los microorganismos indicadores de contaminación fecal, así como, las inadecuadas estrategias de monitoreo para que impacten directamente en el establecimiento de riesgos a la salud. En México, no se han reportado estudios que evalúen la calidad microbiológica de las playas y su relación con estudios epidemiológicos que indiquen la existencia de riesgos a la salud por el contacto con agua de mar en playas recreativas.



Por lo que, existe la necesidad de detectar no sólo la presencia de microorganismos indicadores, si no también, de microorganismos patógenos en el agua de mar y la aplicación de nuevos métodos de detección que sean específicos y sensibles que permitan la predicción de riesgos. El método 1623 (EPA, 2001), permite detectar y cuantificar la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua, sin embargo, cada laboratorio debe demostrar su capacidad para el empleo de este método y de esta manera utilizarlo en la detección de ambos protozoarios, al cual se pueden acoplar a técnicas moleculares que confirmen su presencia y aumenten la sensibilidad de detección.

### Calidad del Agua de Mar

La calidad del agua continúa siendo uno de los principales temas en la microbiología ambiental, debido a que, nuevos patógenos son identificados con mayor frecuencia. Diversos estudios sugieren que del 10 al 50% de las enfermedades asociadas a diarreas son causadas por agentes microbianos presentes en el agua (Maier y col., 2000).

Los criterios de calidad microbiológica de aguas costeras para uso recreativo se basan en estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que tienen por objetivo la adopción de estándares de calidad que sean medibles e implementables. Dichos estándares, se basan en la detección de indicadores que se han asociado a un

aumento en la frecuencia de diferentes tipos de enfermedades gastrointestinales y a enfermedades respiratorias agudas; los indicadores empleados son los estreptococos/enterococos, considerados como un grupo de bacterias indicadoras de contaminación fecal, que pueden brindar una base para asociar un efecto sobre la salud por el contacto con aguas recreativas (OMS, 2003).

La calidad del agua se basa en el número de bacterias indicadoras presentes en un volumen de agua determinada, expresadas en unidades formadoras de colonias (UFC). Estas bacterias indicadoras son encontradas típicamente en el intestino de animales y humanos y son excretadas en las heces. Los microorganismos indicadores, no son patógenos pero su presencia indican la probable presencia de microorganismos patógenos que se encuentran en las heces (Griffin y col., 2001). Las bacterias indicadoras comúnmente empleadas para el monitoreo de aguas recreativas son los coliformes totales, coliformes fecales, Enterococos y *E. coli* (NRDC, 2004).

Los estándares para la calidad microbiológica de aguas recreativas establecidos por la OMS (2003), se basan en diversos estudios epidemiológicos que demuestran el riesgo de enfermedades asociadas al contacto con aguas recreativas contaminadas con materia fecal (Cuadro 1). En un estudio reportado por la OMS, asociaron la presencia de enfermedades en personas que realizan actividades recreativas dentro de el agua, en un tiempo mínimo de exposición de diez minutos y con al menos tres inmersiones completas; sin embargo, no son una formula universal para la estimación de riesgo,

además, se estimó que ingieren de alrededor de 20 a 50 mL de agua en una hora actividades recreativas (OMS, 2003). La presencia de enfermedades entre los usuarios se ha relacionado directamente con la ingesta de agua de mar contaminada con descargas de aguas residuales, en un estudio realizado en el Reino Unido se observó la presencia de gastroenteritis en un 12% de las personas seleccionadas para el estudio, infección en los oídos en un 20.9 % e infección en los ojos en un 4.2% (Fleisher y col., 1998). El riesgo de problemas de salud por el contacto con agua contaminada se relaciona directamente con la calidad microbiológica del agua de mar (Prieto y col., 2001).

Las guías recomiendan que la evaluación de la calidad microbiológica del agua, la cual debe ser acompañada de una inspección sanitaria, debe ser interpretada o modificada con base en los factores locales y regionales, tales factores pueden incluir la naturaleza o frecuencia de enfermedades endémicas, características socioculturales y económicas de la población, aspectos ambientales y técnicos (OMS, 2003).

**Cuadro 1. Estándares para la Evaluación Microbiológica de Aguas Recreativas**

<b>Enterococos UFC/100 ml</b>	<b>Estimación de riesgo por exposición</b>
$\leq 40$	<1% riesgo de enfermedad GI* <0.3% riesgo de AFRI**
41-200	1-5% riesgo de enfermedad GI 0.3-1.9% riesgo de AFRI
201-500	5-10% riesgo de enfermedad GI 1.9% riesgo de AFRI
> 500	>10% riesgo de enfermedad GI >3.9% riesgo de AFRI

\* GI: Infecciones gastrointestinales

\*\* AFRI: Infecciones respiratorias febriles agudas

(Guidelines for Safe Recreational Water Environments, OMS, 2003)

Los parámetros utilizados en México para determinar la calidad del agua en las playas, están basados a los recomendados por la OMS. La calidad microbiológica de las playas en México, es cambiante a lo largo del año, debido a las descargas de aguas de residuales o por escurrimientos naturales causados por las lluvias. En el 2003, se inició el Sistema Nacional de Información sobre la Calidad del Agua en Playas Mexicanas, a

través de una comisión formada por las Secretarías de Marina, Medio Ambiente, Salud y Turismo, estas dirigidas a su vez por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y la Comisión Nacional del Agua (CNA), de los gobiernos estatales y municipales (COFEPRIS, 2006). El principal objetivo de este programa es la vigilancia y supervisión de la calidad del agua en las playas mexicanas para que contribuyan a elevar la calidad de vida de la población local y garantizar servicios turísticos de nivel internacional (SEMARNAT, 2004).

En el 2004 se elaboraron los Lineamientos para Determinar la Calidad de Agua de Mar para Uso Recreativo de Contacto Primario, a través de la Secretaría de Salud, los cuales establecen las condiciones de muestreo y análisis del agua de mar en los principales destinos turísticos de los 17 estados costeros del país. Los lineamientos establecen la detección y cuantificación de enterococos como indicador de contaminación fecal del agua de mar. Estos lineamientos son compatibles con los estándares internacionales establecidos por la organización Mundial de la Salud (OMS) para las aguas de mar de uso recreativo. Con base en los niveles de enterococos presentes en agua de mar, las playas se han clasificado, en aptas o no, para el uso recreativo (Cuadro 2). Estos lineamientos son aplicables a zonas recreativas de playas de la República Mexicana que de acuerdo a su afluencia turística requieran vigilancia de la calidad del agua (SSA, 2004).

**Cuadro 2. Criterios de Clasificación de Playas**

<b>Enterococos NMP<sup>a</sup>/100 ml</b>	<b>Clasificación de las playas</b>
0-500	Apta para uso recreativo
> 500	No apta para uso recreativo

<sup>a</sup>NMP: Numero mas probable

Sin embargo, las guías internacionales y nacionales no establecen la detección de microorganismos patógenos en aguas recreativas, debido a que éstos, en el ambiente son difíciles de detectar por su baja concentración y las metodologías empleadas son laboriosas y costosas. Es necesario utilizar microorganismos indicadores confiables para predecir la presencia de microorganismos patógenos que se han detectado en aguas superficiales y se han relacionado con brotes epidemiológicos de enfermedades gastrointestinales (*E. coli* O157; H7, virus Norwalk y *Cryptosporidium parvum*) para prevenir sucesos, donde los microorganismos patógenos no se hayan identificado (CDC, 2000). La OMS, sugiere la detección de microorganismos patógenos como virus y protozoarios, los cuales son más resistentes a las condiciones ambientales que las bacterias indicadoras y los monitoreos de rutina no siempre reflejan los riesgos de infección por estos microorganismos, además de que en determinadas áreas geográficas

podrían representar un riesgo a la salud de quienes están en contacto con aguas contaminadas (OMS, 2003).

### Importancia de la Calidad del Agua de Mar

Las zonas costeras y cuerpos de aguas dulces son importantes como lugares de habitación, industria y recreación. Existen usos, no sólo por áreas de baño, surfing, navegación, pesca, acuicultura y otras industrias marinas, sino también por el uso de la tierra para el desarrollo de áreas residenciales, puertos, embarcaderos, marinas e industrias turísticas. El uso de aguas recreativas y las actividades turísticas dependen enormemente de la calidad del ambiente natural y su continuo desarrollo y manejo sustentable (Bartram y Rees, 2000). El asegurar que las aguas de uso recreativo sean operadas lo más seguras posibles hacen que la población obtenga máximos beneficios (OMS, 2003). Las playas contaminadas no sólo afectan a la actividad turística y comercial establecida, sino también, a los posibles visitantes. Nadar en el agua y estar en contacto con el agua contaminada puede provocar infecciones que repercuten en costos por servicios médicos y ausentismo laboral (NRDC, 2004).

En Sinaloa, el sector turismo es la segunda actividad económica más importante y su principal destino turístico son sus playas, destacando Mazatlán como uno de los principales atractivos turísticos por sus extensas playas y su gran afluencia turística

nacional y extranjera. La Bahía de Altata forma parte del desarrollo turístico en el estado y presenta gran afluencia nacional y local. Por lo que, el desarrollo de la región depende de la calidad de los ambientes de uso recreativo y turístico (CGT, 2003).

### Factores que Afectan la Calidad del Agua de Mar

Las aguas costeras pueden ser consideradas como el destino final de diversos productos de la actividad humana que se transportan a través del aire y el agua (Pepper y col., 2006). La calidad microbiológica, física y química de aguas recreativas costeras se ve afectada por diversas fuentes de contaminación. Las principales fuentes de contaminación son las descargas de aguas de ríos que pueden estar cargadas de desechos domésticos, drenes de retorno agrícola y desechos industriales y las descargas de desechos de la población local (Bartram y Rees, 2000; Fayer y col., 2004). Importantes fuentes de contaminación de aguas recreativas incluyen las deficientes prácticas higiénicas de los usuarios, tanques sépticos, descargas de aguas residuales de embarcaciones y presencia de animales domésticos y salvajes (Cotruvo y col., 2004).

La magnitud de la contaminación del ambiente depende de la variedad de factores presentes, incluyendo el número de animales infectados, el número de microorganismos excretados, comportamiento o actividad del huésped, las diferencias étnicas y socioeconómicas de una población, la distribución geográfica, la sanidad, la



calidad del agua, la disponibilidad de alimentos, el clima e hidrología del área (Slifko y col., 2000).

Además de las descargas regulares que desembocan en la zona costera, las descargas irregulares como son las corrientes de agua ocasionadas en periodo de lluvias o el desborde de ríos y las descargas privadas irregulares también contribuyen a la contaminación del agua (Bartram y Rees, 2000).

Se consideraba que la solución a la contaminación era la dilución, sin embargo, con el paso del tiempo, se ha descubierto que los océanos no son suficientes para controlar el volumen de contaminantes que son descargados. En muchos casos, los efectos de los contaminantes pueden ser tan tóxicos que el efecto de dilución no es efectiva, en otras circunstancias, se ha encontrado que los organismos filtradores presentes en estos ambientes bioacumulan compuestos tóxicos que ascienden en la cadena alimenticia y puede afectar a aves y carnívoros, así como a humanos que consumen diversos productos marinos (Pepper y col., 2006).

A pesar de que se depositan, en forma directa un sin número de desechos a las aguas costeras, no existen leyes o normas locales o nacionales que establezcan el monitoreo de protozoarios en aguas estuarinas y costeras, y pocos estudios que indiquen su presencia (Fayer y col., 2004).

### Microorganismos Patógenos Presentes en Agua de Mar

Los microorganismos en el ambiente son ubicuos, de diversos orígenes y son dispersados a través del agua de consumo, de sitios recreativos de agua dulce y salada, y agua de riego (Slifko y col., 2000). Los microorganismos patógenos que pueden ser encontrados en el agua son bacterias, protozoarios y virus. Las principales infecciones o enfermedades asociadas al contacto de aguas de uso recreativo son las gastroenteritis las cuales están asociadas con la ingesta accidental de agua; otras de las enfermedades relacionadas son las enfermedades respiratorias agudas, y las infecciones de ojos, oídos, nariz, garganta y piel que se asocian con el contacto directo con el agua (Bartram y Rees, 2000).

Los microorganismos patógenos entéricos que han asociado a gastroenteritis por el contacto con aguas recreativas incluyen *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, Hepatitis A, Coxsackie A y B y virus Norwalk (APHA, 1999). Los patógenos entéricos presentes en el agua, son excretados en gran cantidad en las heces de animales y humanos infectados. La principal ruta de transmisión de los patógenos entéricos es la ruta fecal-oral y son transportados fácilmente a través del agua y los alimentos, debido a su gran resistencia a los factores ambientales (Pepper y col, 2006).

Además de los microorganismos patógenos introducidos a las aguas recreativas a través de la contaminación fecal de humanos y animales, un número diverso de

microorganismos patógenos se pueden encontrar en áreas recreativas de manera natural o introducidos al ambiente acuático y capaces de colonizar el ambiente, entre éstos, se encuentran *Vibrio* sp. que se han asociado a infecciones intestinales y extraintestinales, *Aeromonas* spp. que causan gastroenteritis; *Acanthamoeba* sp. que causa encefalitis granulomatosa amebiana y queratitis; *Naegleria fowleri*, asociada a meningoencefalitis y *Leptospira* sp. causante de leptospirosis (OMS, 2003).

#### Factores que Afectan la Presencia de Microorganismos en el Agua

La presencia de patógenos en agua depende de varios factores: la incidencia de enfermedades entéricas (el número de individuos con la enfermedad en la población), el número de portadores en la población, la estación del año, las condiciones sanitarias y el consumo o uso del agua (Slifko y col., 2000). La mayor incidencia de las principales infecciones entéricas es estacional y de climas templados. De ésta manera, la mayor incidencia de infecciones debida a enterovirus es a finales del verano e inicios del otoño, mientras que, infecciones por rotavirus tienden a aumentar a principios del invierno. Las infecciones por *Cryptosporidium* aumentan a principios de la primavera y otoño. Las razones de la presencia de infecciones entéricas en diferentes estaciones del año no está completamente descifrada, pero diversos factores juegan un papel importante, estos

pueden asociarse con la sobrevivencia de microorganismos en el ambiente acuático (Pepper y col., 2006).

De manera general, los virus y los protozoarios patógenos sobreviven más tiempo en el agua que las bacterias patógenas, lo cual depende de un número de factores, donde la temperatura es probablemente el factor más importante que afecta su sobrevivencia. Otro factor que influye en la presencia de patógenos entéricos es la luz UV, proveniente del sol, que participa en la inactivación de bacterias indicadoras en la superficie del agua (Pepper y col, 2006). Otros factores que afectan la sobrevivencia de los microorganismos son el pH, altas y bajas concentraciones de sales, bajas concentraciones de nutrientes y altas concentraciones de compuestos tóxicos (Atlas y Bartha, 1993).

### Generalidades de los Microorganismos de Estudio

#### **Protozoarios**

Son organismos unicelulares eucariotas que se encuentran dentro del reino Protista. Algunos protozoarios forman estados de resistencia como quistes o esporas. El quiste resulta de la formación de una pared gruesa alrededor del organismo, y se forman bajo condiciones ambientales adversas, lo que los hace resistentes a la desecación, a la

falta de nutrientes, a altas temperaturas, a la falta de oxígeno, a la acumulación de compuestos tóxicos, a la respuesta inmune del huésped y la exposición a agentes químicos utilizados en el tratamiento de agua potable y aguas residuales (Bitton, 1994; Quiroz, 2005). Al estado vegetativo móvil de un protozooario se le conoce como trofozoito (Quiroz, 2005).

Los protozoarios abundan en océanos, agua dulce, suelo y cuerpos de animales y plantas. En general, su tamaño es microscópico y aunque consta de una sola célula con uno o más núcleos, tienen estructura compleja con fisiología y comportamiento diferente. La mayoría de las formas celulares están presentes en los protozoarios y cada *Subphylum* tiene su forma característica (Quiroz, 2005).

Se clasifican de acuerdo a su morfología estructural y a sus mecanismos de movilidad. Las características morfológicas se basan en la formación de colonias (unicelular o en colonias), estilo de nadar (sedentarismo o móvil) estructuras externas (desnudos, cáscara o escamas), pigmentación (presente o ausente) y efectos de asociación con organismos (predadores o simbióticas). Así, los protozoarios se clasifican con base a su tipo de locomoción en cuatro grupos principales Mastigophora (Flagelados), su movimiento lo realizan por medio de flagelos; Sarcodina (Amebas), son protozoarios que se mueven mediante pseudópodos (falsos pies); Ciliophora (Ciliados), los cuales utilizan cilios para su locomoción e incluso para su alimentación y

los Sporozoans (Sporozoa), los cuales no poseen estructuras de locomoción y son únicamente parásitos.

Los protozoarios son parásitos, aunque la mayoría no son patógenos, se reproducen sexual (conjugación y singamia) y asexualmente (fisión binaria, gemación o esquizogonia) (Bitton, 1994; Maier y col., 2000). El control de los protozoarios parásitos ha resultado una labor difícil, debido a sus características morfológicas; son resistentes a la desinfección, tiene un amplio rango de rutas de transmisión, incluyendo el agua, alimentos, vectores y el contacto directo de persona a persona, además, de una variedad de mamíferos (roedores, perros, monos, gatos, simios, humanos, vacas) sirven de huéspedes reservorios, contribuyendo a la propagación de estas poblaciones de protozoarios parásitos, por lo que se les conoce como zoonóticos por la capacidad de transmitir la enfermedad a humanos (Maier y col., 2000).

Los principales protozoarios patógenos presentes en el agua que constituyen un riesgo a la salud humana se encuentran *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba castellanii*, *Naeferia gruberi*, *Balantidium coli* y *Cryptosporidium parvum* (Bitton, 1994).

Cryptosporidium spp.: Ernest E. Tyzzer fue el primero en describir *Cryptosporidium muris* en las glándulas gástricas de ratones de laboratorio en 1907, también describió a *Cryptosporidium parvum* en roedores y dio las primeras descripciones de ambas

especies que son utilizadas en la actualidad (Xiao y col., 2004). Fue a mediados de 1950 que *Cryptosporidium* se observó en otros organismos, *Cryptosporidium meleagridis* fue descubierta en pavos domésticos y mostraron ser causa de numerosas pérdidas económicas. En 1976, la cryptosporidiosis fue reportada en humanos, pero no se supo si la enfermedad fue esporádica o asociada sólo con personas cuyo sistema inmunológico se encontraba inmunodeprimido. Surgió como una enfermedad emergente en los inicios de 1980's con la identificación del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana Adquirida (SIDA). Las infecciones han sido identificadas en gran número de niños en guarderías y en individuos normales. En la ganadería, la cryptosporidiosis es una enfermedad importante en becerros recién nacidos (Xiao y col., 2004). Cada especie de *Cryptosporidium* tiene un amplio rango de huéspedes en los cuales este puede desarrollarse. El sitio usual de infección es el tracto gastrointestinal, pero algunas especies también se desarrollan en otros órganos tales como del sistema respiratorio (Marquardt y col., 2000).

Morfología.- El estado infectivo de estos protozoarios son los ooquistes que son excretados en las heces, poseen una estructura esférica o ligeramente ovoidal, se presentan algunas variaciones entre las diferentes especies, pero miden de 4.5-7.5µm de largo y 4.2-5.7µm de diámetro. Los ooquistes poseen una doble pared y una estructura interna formada por cuatro esporozoitos vermiformes y cuerpos residuales no muy

visibles. Los trofozoitos representan el estado transitivo de esporozoitos y merozoitos a merontes. Los trofozoitos tienen forma circular de 2µm de largo por 1.3µm de ancho (Thompson y col., 2005).

Taxonomía.- El género *Cryptosporidium* es un protozoario que pertenece al Phylum Apicomplexa, Clase Sporozoa, Subclase Coccidia y Orden Eucoccidiida, Suborden Eimeriina, Familia Cryptosporidiidae (Bitton, 1994; Cordero del Campillo y col., 1999). Con base en la especificidad del hospedador, morfología de los ooquistes y lugar de infección se consideran válidas algunas especies dentro del género, las cuales se muestran en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Nombre de las Especies y Hospederos Asociados a *Cryptosporidium***

Nombre	Hospederos	Patogénesis
<i>Cryptosporidium muris</i>	Roedores y algunos mamíferos	Media
<i>C. parvum</i>	Mamíferos incluyendo el humano y rumiantes domésticos	Severa
<i>C. hominis</i>	Humanos y changos	Severa



---

<i>C. andersoni</i>	Ganado vacuno, camellos, borregos	Moderada
<i>C. meleagridis</i>	Pavos y otras aves de corral	Moderada
<i>C. wrairi</i>	Puercos de guinea	Moderada
<i>C. felis</i>	Gatos	Moderada
<i>C. canis</i>	Perros, coyotes, zorros y humanos	Moderada
<i>C. molnari</i>	Peces	Moderada
<i>C. serpentis</i>	Serpientes	Moderada
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos, serpientes	Moderada
<i>C. nasorum</i>	Peces	Moderada
<i>C. baileyi</i>	Pollos domésticos y otras aves de corral	Moderada
<i>C. galli</i>	Aves de corral	Severa

---

Fuente: Xiao y col., 2004.

Ciclo de vida.- *C. parvum* sirve como modelo de ciclo de vida para este género. Las fases del ciclo (asexuales y sexuales) ocurren en el mismo huésped. Los ooquistes esporulados, que contienen cuatro esporozoitos, son excretados a través de las heces del huésped infectado y posiblemente, a través de otras rutas como las secreciones respiratorias (Figura 1, 1). La transmisión de *Cryptosporidium* ocurre principalmente, a través del contacto con agua contaminada (por ejemplo, agua de beber o aguas recreativas). Ocasionalmente, sirven como vehículos de transmisión los alimentos. La transmisión zoonótica y antroponótica ocurre a través de animales infectados o la exposición a agua contaminada por heces de animales infectados (Fig. 1, 2). Después de la ingestión (y posiblemente la inhalación) por un huésped susceptible (Fig. 1,3), ocurre la exquistación o desenquistamiento (a). Los esporozoitos son liberados y parasitan las células epiteliales (b, c), del tracto gastrointestinal u otros tejidos (tracto respiratorio). Los esporozoitos se invaginan, siendo englobados por la membrana de la célula huésped, que encapsula al protozoario en una vacuola parasitófora. En dichas células, el parásito se multiplica asexualmente, sufre divisiones nucleares (esquizogonia o merogonia) (d, e, f), y se forman 8 o 4 merozoitos dependiendo de que se trate una esquizogonia de generación I o II. Se reconoce la existencia de dos tipos de esquizontes o merontes; el Tipo I, el primero en aparecer en el ciclo. El meronte Tipo I, produce de 6 a 8 merozoitos, invade el epitelio celular y forma el meronte Tipo II, en el cual se producen 4 merozoitos (f). El Tipo I puede pasar a Tipo II o bien retornar a la fase de generación

de Tipo I. La mayoría de los merozoítos Tipo II, que entran a la célula hospedadora van a entrar al proceso de diferenciación sexual para formar microgametocitos y macrogametocitos que pasan al estado de macrogametos, mientras que los microgametocitos sufren divisiones nucleares para formar varios microgametos, y posteriormente se da la reproducción sexual (gametogonia), donde se unen los microgametos (gameto masculino) (g) y los macrogametos (gametos femeninos) (h). Los macrogametos poseen gránulos de polisacáridos (amilopectina) en la parte basal y cuerpos formadores de la pared en la periferia. Los microgametos carecen de flagelos y se dirigen hacia los macrogametos siguiendo el flujo intestinal o mediante la contracción y extensión de los microtúbulos intracitoplásmicos. La fertilización se acompaña de la penetración del microgameto a través de la vacuola parasitófora y de la membrana del microgameto. Después de la fertilización de los macrogametos por los microgametos (i), se forma un cigoto el cual se desarrolla en un ooquiste y la esporulación toma lugar mientras este se establece en el tejido (j, k) del huésped infectado. La formación de la pared del ooquistes acontece antes de la esporulación, que tiene como consecuencia la formación de 4 esporozoítos y da lugar a dos tipos de ooquistes. El 80% de los ooquistes presenta una doble pared quística, que se denominan ooquistes de pared gruesa, son las formas de resistencia que encontramos en el ambiente, excretados por el huésped y responsables de la transmisión entre los huéspedes (j). El 20% restante son los ooquistes de pared delgada (k), rodeados de una sola unidad de membrana y se relacionan con la

autoinfección. Su pared, relativamente débil se rompe pronto tras la liberación por la célula huésped y los esporozoítos penetran en las células epiteliales adyacentes, reiniciándose el ciclo endógeno. Los ooquistes son infectivos después de ser excretados, permitiendo así la transmisión directa e inmediata por la ruta fecal-oral (Tay, 1995; Cordero del Campillo y col., 1999; Marquardt y col., 2000; CDC, 2005a; Thompson y col., 2005).

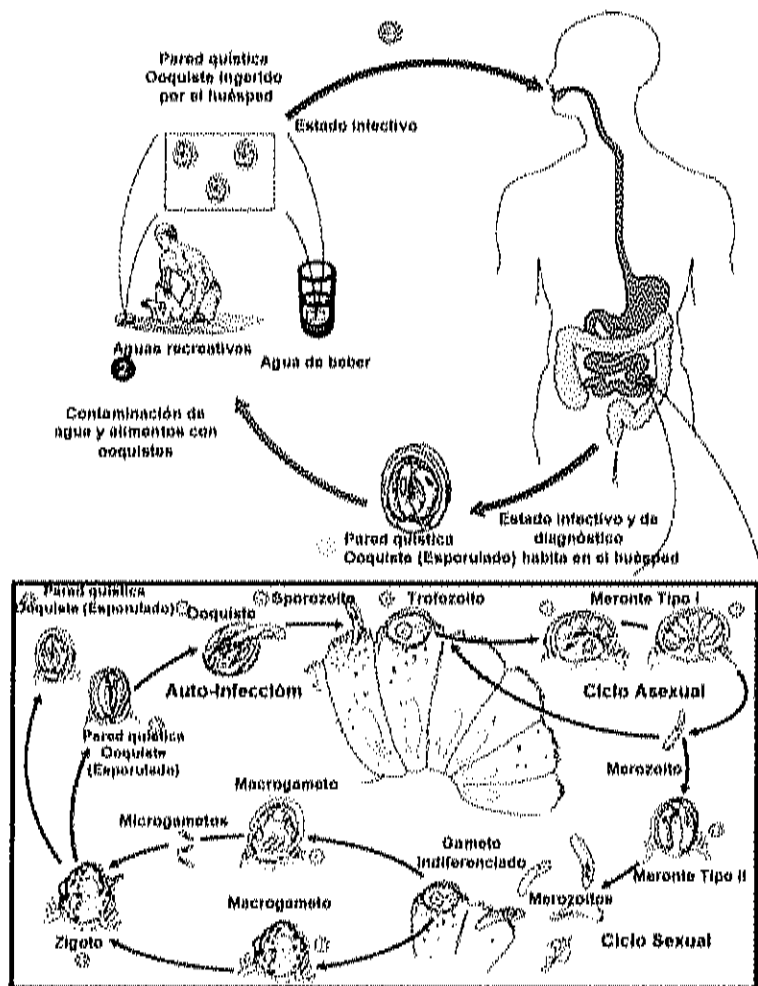


Fig. 1 Ciclo Biológico de *Cryptosporidium parvum* (CDC, 2005a)

Patogenicidad - *Cryptosporidium* se ha relacionado con la infección de diversas especies de animales (ganado vacuno, corderos, pavos, pollos, ratones, puercos, perros, gatos), pero la infección de humanos se reportó en 1970 (Bitton, 1994). La invasión de los enterocitos por el protozoo daña y destruye células absorbentes y ocasiona su extensión al lumen intestinal (Thompson y col., 2005). Esta colonización produce atrofia parcial de las vellosidades y fusión de ésta, quedando la superficie de absorción claramente disminuida. La mala absorción que origina estos procesos puede hacerse patente incluso antes de que se produzca la atrofia de vellosidades debido a la reducción de las enzimas unidas a la membrana, fundamentalmente la lactasa. El organismo intenta reemplazar las células dañadas mediante la hiperplasia de las criptas, sustituyendo las células maduras dañadas por otras nuevas cuya funcionalidad absorptiva y enzimática es menor, siendo, además, secretoras de iones Cl<sup>-</sup>. Este cuadro puede agravarse por el paso de fluidos de la vellosidad a la luz intestinal, debido al aumento en la presión osmótica por el cúmulo en el lumen de nutrientes que no se absorben. Como consecuencia de todos los factores anteriormente expuestos, se rompe el equilibrio entre absorción y secreción (Cordero del Campillo y col., 1999; Thompson y col., 2005).

Enfermedad:- La cryptosporidiosis es una enfermedad causada por especies de *Cryptosporidium*, que parasita el aparato digestivo del hombre y de un gran número de animales, por lo que es considerada una zoonosis (Tay, 1995). *Cryptosporidium* afecta la

parte baja del intestino delgado, el yeyuno e ileum, en huéspedes inmunodeprimidos, el tracto gastrointestinal completo se ve afectado, desde el esófago hasta el recto (Marquardt y col., 2000). El periodo de incubación de la enfermedad, es decir el tiempo entre la infección y la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad es de 2-14 días (Maier y col., 2000; Thompson y col., 2005). Los principales signos clínicos asociados con la infección son la diarrea, asociada a la excreción de un gran número de ooquistes en las heces ( $10^6$  a  $10^7$ /g), la cual puede o no estar asociada con dolor abdominal. En casos severos se presentan diarreas acuosas y es frecuente encontrar sangre en las heces. Otros signos asociados se presentan como malestar en general, fiebre, fatiga, pérdida de apetito, náuseas y vómito, la deshidratación y la pérdida de peso son resultados directos de los síntomas (Thompson y col., 2005). En personas inmunocompetentes los signos clínicos duran de 10-14 días, pero en individuos inmunocomprometidos los signos pueden presentarse por meses o años (Thompson y col., 2005). Para determinar si el huésped es afectado por cryptosporidiosis se basa en la observación de los signos clínicos típicos y la búsqueda de los ooquistes en las heces que conducen a estudios serológicos (Marquardt y col., 2000). El diagnóstico etiológico resulta complicado debido al escaso tamaño de los ooquistes (4-5  $\mu$ m), por lo que se hace imprescindible la utilización de técnicas de tinción de extensiones fecales (técnica de Ziehl-Neelsen, técnica de Heine) o flotación con soluciones muy densas (solución Seather) (Cordero del Campillo y col., 1999).

Prevalencia/brotos. - En México, las autoridades de salud carecen de información precisa de brotes de cryptosporidiosis y muy pocos estudios se han realizado (Cotruvo y col., 2004). La cryptosporidiosis es una enfermedad en humanos distribuida alrededor del mundo. Aproximadamente de los 49 brotes epidemiológicos reportados por el consumo de agua contaminada con *Cryptosporidium* se presentaron entre 1984 y 1999, principalmente en Norte América, Reino Unido y Japón (Fayer y col., 2000). Sin embargo, la prevalencia de *C. parvum* es mayor en las áreas menos desarrolladas (Asia, África y América del Sur) con porcentajes entre el 3-20%, con una especial repercusión en la población infantil de las zonas más desfavorecidas. En Europa (1-2%) y en América del Norte (0.6-4.3%) los porcentajes son menores. En pacientes con SIDA, *Cryptosporidium* ha sido identificado como causa de diarreas crónicas en 11-21 % de los casos que se presentan en países industrializados y en 12-85% de los países en desarrollo (Cordero del Campillo y col., 1999).

En los últimos doce años se han reportado brotes asociados a aguas recreativas por la presencia de *Cryptosporidium* afectando alrededor de 10 000 personas en todo el mundo (Fayer y col., 2000). En piscinas públicas la combinación de la contaminación frecuente con materia fecal, la resistencia de los ooquistes al cloro (Carpenter y col., 1999), la baja dosis infecciosa y el gran número de bañistas facilita la transmisión de cryptosporidiosis (Fayer, 2004). El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos, reportó que durante 2001-2002 ocurrieron un total de 65 brotes

epidemiológicos por el contacto con aguas recreativas, de éstos 30 se relacionaron con enfermedades gastrointestinales y el 50% de éstas se identificó a especies de *Cryptosporidium* como el agente etiológico responsable de las mismas, así como serotipos de *E. coli* toxigénica y norovirus fueron también asociados con brotes a la exposición de aguas recreativas contaminadas (CDC, 2004).

Resistencia de los ooquistes.- Los ooquistes de *Cryptosporidium* son infectantes en el momento de ser excretados en las heces y están perfectamente adaptados para la sobrevivencia en el ambiente, siendo muy resistentes a las condiciones variables de éste con la única excepción de la desecación y la congelación. La desecación es letal para los ooquistes de *Cryptosporidium*, después de ser expuestos 2h en aire seco a una temperatura ambiente, solo el 3% ooquistes sobreviven a esta condición; almacenados a -20°C los ooquistes expuestos por 24h mueren (Fayer y Nerad, 1996). En modelos de laboratorio sobre los efectos de los tratamientos de aguas, se ha demostrado que no tienen efecto en la viabilidad de los ooquistes y que se requiere de mayor concentración y largos periodos de contacto (Robertson y col., 1992). Almacenados en agua a 4°C y 15°C permanecen infectivos alrededor de 12 semanas, almacenados a mayor temperatura, 20°C y 25°C, permanecen infectivos 12 y 8 semanas respectivamente, demostrando que la inactivación de los ooquistes por altas temperaturas esta en función de aumento de la actividad metabólica de los ooquistes (King y col., 2005). Los



ooquistes también sobreviven en agua de mar por largos periodos de tiempo (Fayer, 2004), pueden permanecer viables por 35 días a 4°C en agua de mar (Robertson y col., 1992). Otro estudio encontró que los ooquistes se mantienen viables a una salinidad de 10, 20 y 30‰ (‰=g/L= ppt de NaCl) cuando son almacenados a 10°C comprobándose su infectividad en ratones y los ooquistes que se mantuvieron a 20°C fueron infectivos hasta 12 semanas a 10‰ de salinidad, 4 semanas a 20‰ y 2 semanas a 35‰ (Fayer y col., 1998a).

Giardia spp.- *Giardia lamblia*, también llamada *Giardia duodenalis* o *Giardia intestinalis*, fue descrita por primera vez en 1681 por Antonie van Leeuwenhoek, quien la encontró en sus propias heces. El organismo fue descrito a más detalle en 1859, por Vilem Lambl quien identificó a *Giardia* al observar los trofozoítos en las heces de niños con diarrea, y fue a principios del siglo XX que se relacionó las diarreas con la presencia de *Giardia* en las heces. En 1954 Robert Rendtorff confirmó su infectividad en voluntarios humanos con la administración oral de quistes de *Giardia* y en 1915 se le dio el nombre de *G. lamblia* (Marquardt y col., 2000, Adam, 2001). *Giardia* se identifica frecuentemente parasitando el intestino de animales y humanos, se reconoce como un parásito intestinal cosmopolita. Las aguas residuales domésticas son una importante fuente de *Giardia* y animales domésticos y salvajes actúan como reservorios importantes de quistes de *Giardia* (Bitton, 1994; Maier y col., 2000).

Morfología.- Tres tipos diferentes de morfología se han descrito para trofozoitos de *Giardia lamblia*, *Giardia agilis* y *Giardia muris* y estas características son importantes en la diferenciación entre organismos que podrían estar presentes en el contenido intestinal del huésped. Las principales diferencias entre los tres tipos de *Giardia* descritos se basan en las medidas de tamaño y los cuerpos medios, todos poseen ocho flagelos, dos núcleos y un disco ventral adhesivo o suctorio (Wolfe, 1992; Bitton, 1994). Los trofozoitos o forma móvil de *G. lamblia* son piriformes, poseen un cuerpo medio que se localizan en su porción central, cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral) que se originan del beferoplasto y un disco ventral adhesivo que corresponde a menos de la mitad del largo del cuerpo, son de un tamaño de 12 a 15µm de longitud y de 5 a 9µm de ancho; son redondos en su parte anterior y afilado en la posterior; su parte dorsal es convexa y la ventral es cóncava, ligeramente plana (Tay, 1995; Adam, 2001). Los trofozoitos tienen dos núcleos ovoideos vesiculares que contienen un cariosoma central compuesto de cromatina periférica, se localizan en la parte anterior y son simétricos con respecto al eje axial (Tay, 1995). Los trofozoitos de *G. agilis* se ha observado en anfibios el cual es más largo y con menor diámetro y tiene dos cuerpos medios en forma de gota; el trofozoito de *G. muris* es más corto y ovalado y los cuerpos medios son más pequeños, se ha observado en ratones y otros roedores (Adam, 2001). Bajo el microscopio compuesto los quistes de *Giardia* se observan de forma elipsoide u ovalados delimitados y de un tamaño de 8-14µm de largo y de 7-10µm

de ancho (Wolfe, 1992; Tay, 1995). Los quistes poseen dos grupos de organelos; tienen cuatro núcleos y dos grupos de cuerpos medios, y otros organelos que no pueden ser observados claramente. Los quistes están cubiertos por una pared celular quística de 0.3 a 0.5µm de espesor, compuesta por una capa filamentosa externa y una capa interna de dos membranas. La capa externa de la pared quística esta cubierta por una red de filamentos de 7 a 12nm de espesor. El azúcar que compone la capa externa es principalmente galactosamina en forma de N-acetilgalactosamina (Adam, 2001). Los quistes viables presentan movilidad y pueden ser observados girar alrededor de sí mismos dentro de su pared quística (Marquardt y col., 2000).

Taxonomía.- El género *Giardia* es un protozooario que pertenece al Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Mastigophora, Clase Zoomastigophorea, Orden Diplomonadida, Familia Hexamitidae (Cordero del Campillo y col., 1999; Adam, 2001; Quiroz, 2005). Las especies de *Giardia* conocidas se denominan en base al organismo donde se identificaron, es decir en el huésped que no haya sido reportado antes (Cuadro 4). *G. lamblia* es reconocida como patógena que provoca graves cuadros diarreicos y es la más comúnmente identificada en humanos, pero también se le conoce *G. intestinalis* y *G. duodenalis*, por lo que algunos autores las nombran indistintamente (Marquardt y col., 2000; Adam, 2001).

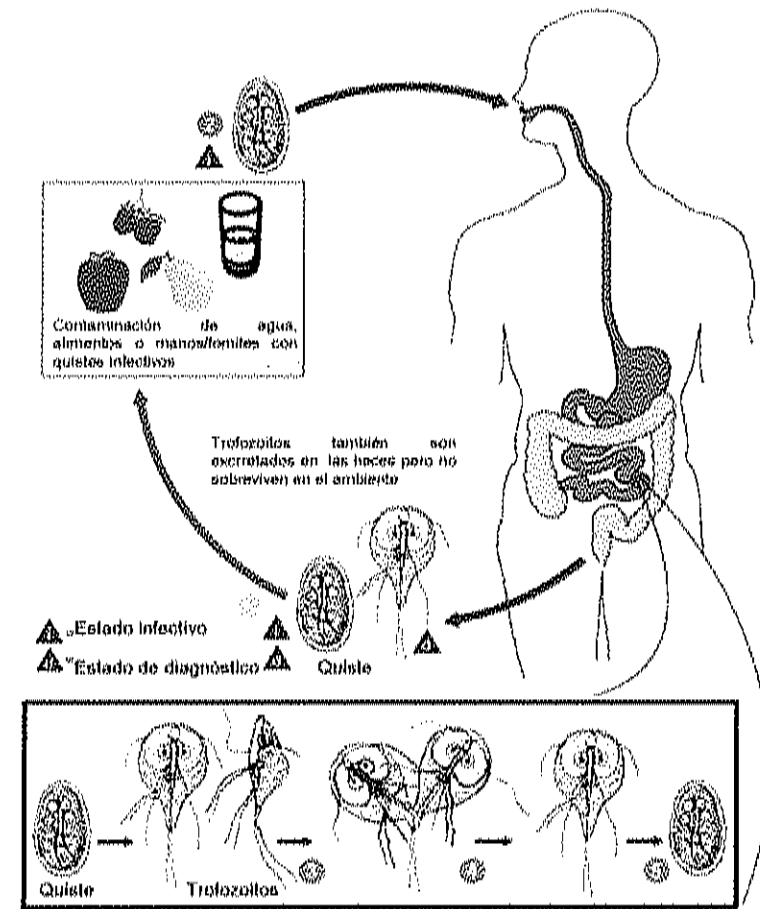
**Cuadro 4. Nombre de las Especies de *Giardia* y sus Hospederos**

<b>Especie</b>	<b>Hospederos</b>
<i>G. lamblia</i>	Humanos, roedores, carnívoros, rumiantes
<i>G. agilis</i>	Anfibios
<i>G. muris</i>	Roedores, pájaros y reptiles
<i>G. ardae</i>	Garzas
<i>G. psittaci</i>	Pájaros
<i>G. microti</i>	Roedores

Fuente: Adam, 2001.

Ciclo de vida.- Los quistes son formas resistentes y son las responsables de la transmisión de la giardiosis, los trofozoitos son pueden estar presentes en las heces (estados diagnósticos) (Fig. 2, 1). La infección puede ocurrir por la ingesta de agua contaminada, alimentos o por la ruta fecal-oral (manos o fomites) (2); en el intestino delgado, ocurre la desenquistación por acción de los jugos gástricos, y los trofozoitos

son liberados (cada quiste produce dos trofozoítos). (3); Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria longitudinal, en la que, primero se duplican y se dividen los núcleos, posteriormente los beferoplastos, emergen nuevos axonemas y flagelos, se divide el disco adhesivo y por último ocurre la separación del citoplasma, permanecen en el lumen del intestino delgado proximal donde pueden encontrarse libres o adheridos a la mucosa por medio del disco adhesivo, con lo cual se da el establecimiento del protozoario, con frecuencia en gran número (4). A medida que los trofozoítos se desprenden del epitelio intestinal, estos pueden ser barridos, por medio de movimientos peristálticos hacia las heces y ser excretados. La enquistación, es decir la transformación del trofozoito a quiste ocurre en la porción final del intestino delgado del huésped, cuando la materia fecal se deshidrata en el colon; en este sitio los trofozoítos retraen sus flagelos en los axonemas tomando el aspecto de cuatro pares de cerdas y es cuando se secreta la pared quística, usualmente ocurre una infección asintomática y los quistes pasan a las heces fecales. Los quistes son generados bajo la influencia de las sales biliares primarias (tauro-glicoquenodeoxicolato y glicolato) pero no por sales biliares secundarias (glycodeoxicolato). El quiste es el estado que se encuentra comúnmente en las heces no diarreicas (5) (Wolfe, 1992; Tay, 1995; Adam, 2001; CDC, 2005b).



**Fig. 2 Ciclo Biológico de *Giardia lamblia* (CDC, 2005b)**

Patogenicidad. *Giardia* spp. ejerce su acción patógena por medio de un mecanismo traumático-irritativo, sobre las células intestinales, lo que ocasiona acortamiento de las microvellosidades intestinales y destrucción del borde en cepillo de las células, ocasiona disminución de la superficie de absorción del intestino delgado (Wolfe, 1992; Adam, 2001). *Giardia* se adhiere a la superficie del intestino delgado a través de la interacción

que se da entre el disco ventral del trofozoíto y la secreción de proteasas de las células del intestino. Bajo la influencia de la tripsina, los trofozoítos de *Giardia* producen una actinina, por la cual se adhieren a la superficie de los enterocitos donde se forma un complejo manosa-actinina unido a receptores específicos del epitelio (Cordero del Campillo y col., 1999; Adam, 2001). La vía por la cual *Giardia* causa el daño en el huésped aún no se conoce, sin embargo, se conoce como consecuencia de lo anterior, altera la digestión y ocasiona la mala absorción de nutrientes en el intestino delgado. Se ha comprobado que quistes de *Giardia* transportan ocasionalmente, virus, bacterias, hongos y micoplasmas (Cordero del Campillo y col., 1999; Marquardt y col., 2000). La ingestión de 100 quistes o más se requieren para el establecimiento de la infección, pero la ingestión de tan solo 10 quistes han sido necesarios para causar la infección administrados en individuos sanos (Wolfe, 1992). Los factores que influyen en la patogenia de *Giardia*, influye el tipo de cepa, por la patogenicidad inherente de cada una de ellas y la cantidad de quistes ingeridos. La edad del huésped también es un factor importante, el estado sanitario y nutricional, el estado inmunológico y la presencia de factores ambientales (Wolfe, 1992; Cordero del Campillo y col., 1999).

Enfermedad.- La enfermedad ocasionada por este parásito en el humano se le denomina giardiosis o giardiasis. Los principales síntomas o signos de esta enfermedad son la diarrea, dolor abdominal, inflamación o flatulencias, náuseas y pérdida de peso por la

falta de apetito, la giardiasis rara vez es fatal, el periodo de incubación es de 7 a 14 días (Maier y col., 2000; Marquardt y col., 2000). Generalmente la diarrea se presenta por largos periodos aproximadamente 7 días lo que indica una infección por *Giardia*, mientras que periodos más cortos de cuadros diarreicos indican la presencia de otro microorganismo (bacterias y virus) (Bitton, 1994; Marquardt y col., 2000). El modo de transmisión es de persona a persona, sin embargo *Giardia* es uno de los principales agentes etiológicos causante de brotes de enfermedades causadas por el consumo de agua contaminada (Bitton, 1994). Frecuentemente se toman una serie de muestras de heces en días alternados para encontrar los quistes o trofozoítos. Los quistes pueden ser concentrados por flotación o sedimentación (Marquardt y col., 2000).

Prevalencia/brotes - La giardiasis se encuentra distribuida por todo el mundo, con mayor prevalencia donde las condiciones higiénicas son pobres y mas frecuentes en zonas tropicales y subtropicales que en los climas frío. Su incidencia es variable, incluso dentro de una misma región (Wolfe, 1992; Cordero del Campillo y col., 1999). La mayoría de los brotes de giardiosis reportados se asocian con el consumo de agua contaminada sin tratar o deficientemente tratadas (Bitton, 1994). En México la giardiosis es una de las parasitosis ampliamente distribuida en la población afectando principalmente a niños, sin embargo no existe información epidemiológica de brotes asociados a su presencia. Las enfermedades infecciosas intestinales se presentan dentro



de las 10 principales causas de mortalidad preescolar a nivel nacional y a nivel estatal son la séptima causa de morbilidad hospitalaria (SSA, 2005). Durante el periodo 2001-2005, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos reportaron 31 brotes epidemiológicos asociados con el consumo de agua contaminada, resultando afectadas 1020 personas de las cuales 51 necesitaron ser hospitalizadas y 7 murieron. De los 31 brotes, en 19 (61.3 %) se identificó el agente infeccioso, 5 (16.1 %) se debieron a parásitos, 3 de ellos se relacionaron con *Giardia intestinalis*, uno con *Cryptosporidium* y uno con *Naegleria fowleri*. En el mismo periodo se presentaron 30 brotes epidemiológicos por el contacto con aguas recreativas, 12 (40 %) fueron causados por parásitos, 11 fueron ocasionados por la presencia de *Cryptosporidium* y uno de ellos por *Giardia intestinales* y ocurrieron principalmente en aguas cloradas (CDC, 2004).

Resistencia de los quistes. - Los quistes de *Giardia* son poco resistentes a la desecación, con buenas condiciones ambientales de temperatura y humedad pueden sobrevivir más de dos meses (Cordero del Campillo y col., 1999). Altas temperaturas afectan la sobrevivencia de los quistes en el ambiente, a una temperatura del agua de 54°C por 10min. destruye los quistes y en agua hirviendo los quistes mueren rápidamente, mientras que pueden sobrevivir por 2 o 3 meses en el agua temperaturas menores de los 10°C y a 21°C pueden permanecer hasta un mes (EPA, 2004). La cloración del agua, inyección de ozono y las radiaciones ultravioletas son eficaces en un 99%, lo que

(Fayer y col., 2004). El agua y los alimentos aumentan la sobrevivencia de los estados infectivos oo/quistes de protegiéndolos de la desecación (Slifko y col., 2000).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se han encontrado distribuidos en el agua, alrededor del mundo. LeChevallier y col. (1991b) encontraron la presencia de este protozoario en un 87% de las muestras de agua superficial analizadas y en un 27% en muestras de agua potable, en Estados Unidos. Wallis y col. (1996), en un estudio realizado en aguas residuales, aguas superficiales y en aguas residuales tratadas, en Canadá, encontraron mayor presencia de quistes de *Giardia* que ooquistes de *Cryptosporidium*. Los quistes de *Giardia* se encontraron en 73% de las muestras analizadas en aguas residuales, 21% en muestras de aguas superficiales y 18.2% en muestras de aguas residuales tratadas, mientras que *Cryptosporidium* en 6.1, 4.5 y 3.5% de las muestras de agua analizadas respectivamente.

Los quistes de *Giardia* han sido detectados en 81% de aguas superficiales y 17% en muestras de agua filtrada (LeChevallier y col., 1991a, 1991b) en los Estados Unidos. *G. lamblia* sigue siendo uno de los agentes etiológicos frecuentemente identificados en brotes epidemiológicos por el consumo de agua contaminada. *Giardia* y *Cryptosporidium* se conoce son altamente resistentes a los procedimientos utilizados para el tratamiento de aguas, en un estudio realizado en plantas tratadoras de agua en Italia, se detectó la presencia de quistes de *Giardia* en todas las muestras analizadas, mientras que *Cryptosporidium* no fue detectado (Caccio y col., 2003), por lo que esto

implica el gran riesgo asociado con el rehúso de aguas residuales o la descarga de las mismas a cuerpos de agua, como son ríos, lagos, lagunas o a zonas costeras. Ono y col. (2001), detectaron la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en 47% de las muestras analizadas de ríos, cercanos a poblaciones que realizan diversas actividades agrícolas, ganaderas y pesqueras.

Diversas prácticas agrícolas como son el uso de heces de animales para abono, el pastoreo de ganado en las tierras, el arrastre de la tierra, entre otras, contribuyen a la contaminación de fuentes de agua para riego (Slifko y col., 2000). Chaidez y col. (2005), encontraron la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en 48% de las muestras analizadas en aguas superficiales utilizadas para riego de cultivos y 50% de las muestras fueron positivas para quistes de *Giardia*.

Las descargas de aguas residuales en las zonas costeras es una práctica muy común en todo el mundo y éstas pueden estar cargadas de protozoarios patógenos que aumenten el riesgo de transmisión al realizar actividades recreativas en estas zonas. En playas recreativas en Mamala Bay, Hawaii, cercanas a descargas de aguas residuales, se encontraron altas concentraciones de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* (Johnson y col., 1995a). Los estados infectivos también pueden ser transportados en organismos acuáticos que actúan como filtradores. Por ejemplo bivalvos que actúan como reservorios concentradores de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* viables y probablemente otros estados trasmisibles zoonóticos encontrados en aguas

dulces, estuarinas y marinas contaminadas con heces (Fayer y col., 1997; 1998a; Gómez-Bautista y col., 2000; Gómez-Couso y col., 2005).

### Métodos de Detección en el Ambiente

Los métodos de detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en muestras de agua generalmente incluyen tres etapas: concentración de la muestra y elución; separación de los quistes y ooquistes de los contaminantes presentes en la muestra y la tinción e identificación de los protozoarios (Hsu y col., 2000).

### **Técnicas de Concentración con Filtros (Filtración)**

Los parásitos en muestras ambientales se encuentran en bajas concentraciones, y dentro de los principales métodos utilizados son el análisis microscópico precedido de un paso de concentración como es la sedimentación, filtración o centrifugación (Zarlenga y Trout, 2004). El muestreo de agua para su análisis microbiológico se realiza de acuerdo a la metodología seleccionada para su procesamiento en el laboratorio o en el sitio de muestreo. La cantidad de agua depende de la muestra ambiental a analizar, el cual puede variar de 1mL a 1000L, la frecuencia de muestreo también depende del tipo de agua. Para aguas de mar de uso recreativo, las muestras frecuentemente se recolectan

con periodicidad dentro de un área definida de interés. Las técnicas de filtración por membrana o con filtros de cartucho fueron los inicialmente utilizados para remover organismos microscópicos de las muestras de agua (Maier y col., 2000; Zarlenga y Trout, 2004).

Diversos métodos se han desarrollado para la concentración y detección de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*. La Agencia de Protección Ambiental, desarrollo el Método Estándar para la Detección de Protozoarios en el agua: ICR (Information Collection Rule) (EPA, 1995), utilizando anticuerpos fluorescentes para su identificación. En este método se utilizan filtros de cartucho de polipropileno tejido, de 1µm de tamaño de poro, después de la filtración los oo/quistes son eluidos, concentrados por centrifugación y purificados por medio de un gradiente de densidad por centrifugación con Percoll-sucrosa, los oo/quistes son teñidos con anticuerpos monoclonales fluorescentes sobre filtros de membranas de acetato de celulosa, finalmente el filtro es colocado bajo el microscopio de epifluorescencia. Los cuerpos fluorescentes de tamaño y forma correcta son identificados y examinados por microscopio diferencial de contraste de fases para observar la presencia de cuerpos internos (Maier y col., 2000).

Sin embargo, este método consume demasiado tiempo y es engorroso, tiene ciertas desventajas asociadas a su análisis, estas incluyen la baja capacidad de recuperación reportada de menos del 50%, para ambos protozoarios (LeChevallier, y

col.,1995), tiempo de procesamiento de 1-2 días; interferencias causadas por la fluorescencia de algas; incapacidad para determinar la viabilidad y finalmente una limitación en el volumen de la muestra que puede ser recolectada en algunos sitios debido a la turbidez alta y la saturación del filtro. Hsu y col. (2000), reportaron eficiencias del método ICR en aguas superficiales y tratadas de 28.9% y 30% para *Giardia* y de 9.3 y 9.8% para *Cryptosporidium*. A pesar de las diferencias marcadas en los porcentajes de recuperación este método fue utilizado para la detección de estos dos protozoarios en muestras de agua superficial en Estados Unidos (LeChevallier y col., 1991a,b).

En 1999, esta técnica fue mejorada por la EPA en un esfuerzo por superar el método ICR y elaboró el método 1622 para la detección de *Cryptosporidium* en agua y el método 1623 para la detección simultánea de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua, los cuales han sido modificados en varias ocasiones para evitar algunos de los principales problemas que se venían dando con la turbidez y en el 2001 se combina a la filtración, elución y la concentración de la muestra por centrifugación; un paso de purificación por medio de separación inmunomagnética para proveer una muestra más limpia para una detección final (Maier y col., 2000; Zarlenga y Trout, 2004; EPA, 2001). El método 1623 ha sido evaluado en diferentes tipos de aguas y se han logrado obtener mayores porcentajes de eficiencia de recuperación, DiGiorgio y col. (2002) obtuvieron rangos de eficiencias de 36 a 75% para *Cryptosporidium* y 0.5 a 53 % para *Giardia*, mencionan

col.,1995), tiempo de procesamiento de 1-2 días; interferencias causadas por la fluorescencia de algas; incapacidad para determinar la viabilidad y finalmente una limitación en el volumen de la muestra que puede ser recolectada en algunos sitios debido a la turbidez alta y la saturación del filtro. Hsu y col. (2000), reportaron eficiencias del método ICR en aguas superficiales y tratadas de 28.9% y 30% para *Giardia* y de 9.3 y 9.8% para *Cryptosporidium*. A pesar de las diferencias marcadas en los porcentajes de recuperación este método fue utilizado para la detección de estos dos protozoarios en muestras de agua superficial en Estados Unidos (LeChevallier y col., 1991a,b).

En 1999, esta técnica fue mejorada por la EPA en un esfuerzo por superar el método ICR y elaboró el método 1622 para la detección de *Cryptosporidium* en agua y el método 1623 para la detección simultánea de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua, los cuales han sido modificados en varias ocasiones para evitar algunos de los principales problemas que se venían dando con la turbidez y en el 2001 se combina a la filtración, elución y la concentración de la muestra por centrifugación; un paso de purificación por medio de separación inmunomagnética para proveer una muestra más limpia para una detección final (Maier y col., 2000; Zarlenga y Trout, 2004; EPA, 2001). El método 1623 ha sido evaluado en diferentes tipos de aguas y se han logrado obtener mayores porcentajes de eficiencia de recuperación, DiGiorgio y col. (2002) obtuvieron rangos de eficiencias de 36 a 75% para *Cryptosporidium* y 0.5 a 53 % para *Giardia*, mencionan

que la variabilidad de los resultados es debido a la turbidez presente en el agua, así como a las condiciones iniciales de los ooquistes utilizados para la inoculación.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es uno de los métodos más utilizados en la actualidad por los microbiólogos para la identificación de microorganismos (Maier y col., 2000). La PCR es una técnica utilizada para la amplificación *in vitro* de una secuencia de ADN específica. El principio de la PCR incluye la múltiple síntesis enzimática de ADN, utilizando dos primers oligonucleótidos que hibridizan a las cadenas opuestas de ADN molde de interés. En teoría el número de copias es duplicado durante cada ciclo, por lo que la PCR puede multiplicar moléculas de ADN millones de veces en un tubo. Cada ciclo de PCR consta de: la desnaturalización o separación de la doble cadena de ADN molde, por medio de calor, después se da la alineación de los primers específicos para el ADN molde y por último la extensión de la cadena por medio de una DNA polimerasa estable al calor (Pepper y col, 2006). El producto de PCR es visualizado en un gel de electroforesis de agarosa y el tamaño es estimado por la comparación con estándares de ADN de tamaño conocido (Maier y col., 2000).



Existen numerosos reportes de la aplicación de la PCR en la detección de microorganismos en el agua, principalmente patógenos que no son fácilmente cultivables o cuando se requiere una rápida detección e identificación. Patógenos protozoarios importantes como *Cryptosporidium* y *Giardia*, también han sido detectados utilizando técnicas moleculares. Otras aplicaciones de la PCR en el ambiente es la detección de microorganismos en mariscos, como moluscos, ostras y almejas, se han asociado con brotes de comida contaminada (Lederberg, 2000). Las ventajas de la PCR incluyen elevada sensibilidad, análisis rápidos de varias muestras, relativamente, bajo costo, detección simultánea de varios patógenos y la capacidad para discriminar entre especies y cepas si se seleccionan los oligonucleótidos adecuados (Rochelle y col., 1997b). Diversos estudios describen la utilización de diferentes pares de primers para la detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en muestras ambientales. Johnson y col., (1995b), utilizaron primers que amplifican una secuencia de la subunidad 18S del ARNr, en el que se obtiene un producto de 435 pb, la sensibilidad de la metodología fue de 1-10 ooquistes en preparaciones purificadas. Mahbubani y col., (1991; 1992), desarrollaron una PCR para la detección de *Giardia* spp. y la diferenciación de *G. duodenalis* de *G. muris* y *G. ardae*. Para la identificación de *Giardia* spp. se utilizaron primers que amplifican la región del gen *giardina* de 171 pb y en la diferenciación *G. duodenalis* se utilizaron primers que amplifican el gen *giardina* de 218 pb, la sensibilidad de la técnica fue de un quiste.

A partir de estos y otros estudios, ha sido posible la identificación de *Cryptosporidium* en aguas superficiales (Xiao y col., 2001) y la genotipificación en muestras de aguas residuales (Jiang y col., 2005), así como, la identificación, genotipificación y diferenciación de especies de *Giardia* en aguas residuales (Sulaiman y col., 2004). Por medio de técnicas moleculares también ha sido posible la determinación de la viabilidad de los ooquistes, a través de la amplificación de un gen que codifica para una proteína de choque térmico denominado *hsp 70*, en quistes de *Giardia* (Abbaszadegan y col., 1997) y en ooquistes de *Cryptosporidium* (Stinear y col., 1996).

Para la detección de estos dos protozoarios en agua también se ha acoplado la PCR al método 1623 obteniendo con ello, además de la detección, cuantificación, la confirmación de las muestras positivas y la posible diferenciación de especies presentes en muestras ambientales (Hallier-Soulier y Guillot, 2000). Para el desarrollo de técnicas moleculares y genéticas de protozoarios patógenos en el agua, incluyen la identificación y subtipificación de las especies, lo cual contribuirá en la identificación de la fuente de contaminación ambiental (Slifko y col., 2000).

### **Separación Immunomagnética**

La separación inmunomagnética (IMS, por sus siglas en inglés), es un eficiente método para la separación y purificación de sustancias o microorganismos blanco que se encuentran en matrices heterogéneas. Se utilizan anticuerpos conjugados a esferas paramagnéticas, las cuales se añaden a la muestra para concentrar y purificar los antígenos, utilizando un magneto. La IMS se ha convertido rápidamente en una técnica muy popular para la manipulación específica de microorganismos, proteínas y ácidos nucleicos, el aumento en su popularidad es debido a su fácil uso, moderadas condiciones, bajo costo y la capacidad de automatizar el proceso.

La IMS ha sido acoplada a los métodos 1622 y 1623 de la EPA para la detección de *Giardia* y *Cryptosporidium* en agua. La separación IMS utiliza anticuerpos contra antígenos en la superficie de los parásitos. Aun cuando el principio es simple existen varias fuentes de fallas, incluyendo la especificidad y afinidad de los anticuerpos para el parásito y la calidad de las perlas. Cuando las perlas cubiertas con anticuerpos son mezcladas con la muestra, las uniones entre las inmunoglobulinas y los oo/quistes están sujetas a fuerzas de corte durante el proceso de purificación. Así la gran afinidad de los anticuerpos a los parásitos, principalmente los oo/quistes deben permanecer adheridos a las perlas durante la purificación y de particular importancia cuando se analizan muestras ambientales que tienen bajas concentraciones de parásitos (Zarlega y Trout, 2004). La IMS para el aislamiento simultáneo de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes

de *Giardia* es posible con la utilización de kits comerciales. Buckhari y col. (1998) y Rochelle y col. (1999), compararon la eficiencia de dos kits comerciales disponibles de IMS en agua desionizada y agua con diferente turbidez y mencionan que algunos son mejores que otros, obteniendo recuperaciones entre el 35 al 100% dependiendo de la turbidez de la muestra. McCuin y col. (2001), obtuvieron porcentajes de recuperación para ooquistes de *Cryptosporidium* del 62% y para quistes de *Giardia* de 69% en agua desionizada, la media de recuperación para ooquistes de *Cryptosporidium* fue entre 55.9 a 83.1% mientras que para *Giardia*, la media de recuperación fue de 61.1 a 89.6%. Por medio de la IMS es posible recuperar bajas concentraciones de oo/quistes, en muestras inoculadas con 5 y 10 oo/quistes/100µl, la recuperación fue de 51.3 y 69.4% para *Cryptosporidium* y 47.6-90.9% para *Giardia* (McCuin y col., 2001). En la mayoría de los casos la IMS es una de las técnicas disponibles más fáciles para el aislamiento, pero como cualquier otra metodología requiere de su optimización y establecimiento del formato para evitar cualquier problema (Maier y col., 2000).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Presencia de Protozoarios

#### **Selección de los puntos de muestreo**

El muestreo se llevó a cabo en dos playas del estado de Sinaloa, consideradas de mayor afluencia turística, en el periodo comprendido de Noviembre de 2005 a Julio de 2006, con una frecuencia mensual. Se seleccionaron dos puntos de muestreo en la bahía de Altata y tres en Mazatlán (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Puntos de Muestro**

<b>Playa</b>	<b>Punto de muestreo</b>
Altata	Zona I: Restaurantera
	Zona II: Turística
Mazatlán	Zona I: Turística
	Zona II: Monumento al Pescador
	Zona III: Planta de tratamiento de aguas residuales

### **Descripción de los puntos de muestreo**

La bahía de Altata se localiza en la planicie costera de Sinaloa, pertenece al municipio de Navolato, ubicada hacia el suroeste de la Ciudad de Culiacán, sus principales actividades son la pesca, camaronicultura y el turismo, en esta bahía seleccionaron dos zonas (Anexo 1).

Zona I (Restaurantera). Se encuentra geográficamente a  $24^{\circ}37'53.55''$  latitud norte y  $107^{\circ}55'50.92''$  longitud oeste. Es de oleaje suave y poca pendiente. A la orilla de la playa se encuentran establecimientos restauranteros con gran afluencia turística, se realizan actividades pesqueras, y diversas actividades recreativas de contacto primario (nadar) y secundario (navegación). Se observan descargas evidentes de aguas pluviales y desechos orgánicos, productos de la actividad restaurantera.

Zona II (Turística). Se encuentra geográficamente a  $24^{\circ}38'12.57''$  latitud norte y  $107^{\circ}56'5.66''$  longitud oeste. Es de oleaje suave y poca pendiente. Es una zona habitacional. Se realizan actividades recreativas y puede practicarse la natación. Se observan descargas de aguas estuarinas y descargas de aguas pluviales.

La ciudad y puerto de Mazatlán, es uno de los principales destinos turísticos del estado de Sinaloa, se presenta turismo de alto impacto. Una de las características importantes de la zona es la existencia de un gran número de playas, que son especiales

para realizar diversas actividades recreativas y se seleccionaron tres zonas para realizar el muestreo (Anexo 1).

Zona I (Turística). Se encuentra geográficamente a  $23^{\circ}14'35.42''$  latitud norte y  $106^{\circ}27'15.68''$  longitud oeste. Se ubica en la zona dorada de Mazatlán, se le conoce como Playa Gaviotas. La pendiente es regular, oleaje y resaca fuerte. Frente a la playa se localiza la isla Los Venados. En esta playa existe gran afluencia de bañistas nacionales e internacionales y es posible realizar diversas actividades recreativas, como alquilar veleros o paseos en lancha.

Zona II (Monumento al pescador). Se encuentra geográficamente a  $23^{\circ}12'56''$  latitud norte y  $106^{\circ}25'18.67''$  longitud oeste. Se ubica frente a la zona urbana de Mazatlán y se le conoce como Playa Norte. Es una playa extensa, la pendiente regular, oleaje y resaca fuerte. En la orilla existen establecimientos de venta de mariscos y bebidas. Existe una gran afluencia de bañistas, principalmente locales.

Zona III (Planta de tratamiento de aguas residuales). Se encuentra geográficamente a  $23^{\circ}11'4.33''$  latitud norte y  $106^{\circ}25'30.33''$  longitud oeste. Localizada a un costado de la planta tratadora de aguas residuales de la ciudad y el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (UNAM). No se realizan actividades recreativas, la contaminación por descarga de aguas residuales es evidente y se observa la presencia de personas que realizan actividades de pesca.

### **Procedimiento de toma de muestra de agua de mar**

La toma de muestra se realizó de acuerdo a las consideraciones que se establecen en los Lineamientos para Determinar la Calidad de Agua de Mar para Uso Recreativo de Contacto Primario de la Secretaría de Salud (SSA, 2004), que señalan que la toma de muestras se debe realizar en áreas donde la profundidad del agua llegue a 1.0m aproximadamente, (cintura del verificador, 15m a partir de la orilla) y a 30cm aproximadamente bajo la superficie del agua. Se tomó la muestra utilizando recipientes de un volumen de 10L. Las muestras se procesaron de acuerdo al método 1623, establecido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos que se describirá mas adelante (EPA, 2001) (Anexo 2).

### **Determinación de parámetros fisicoquímicos**

El análisis fisicoquímico del agua se realizó con base en lo establecido en el Método Estándar para el Análisis de Agua (APHA, 1999).

Potencial de hidrógeno (pH).- Se realizó la medición "*in situ*" y se empleo un potenciómetro portátil (Oakton wppH). El electrodo se introdujo (HgTaylor 21433) hasta la marca señalada dentro del agua y se registró la lectura.



Temperatura.- La medición de la temperatura se realizó "*in situ*", utilizando un termómetro de vidrio previamente calibrado (HgTaylor 21433). El termómetro se introdujo dentro del agua y se registró la lectura (°C).

Turbidez.- La medición de la turbidez se realizó en el laboratorio utilizando un turbidímetro (HACH, 2100P). Se recolectó una muestra de agua de mar, de la cual se tomó una alícuota de aproximadamente 25 ml y se colocó en una celda de vidrio, la cual se introdujo en el equipo y se registró la lectura, la cual se expresa en unidades nefelométricas de turbidez (UNT).

Salinidad.- La medición de salinidad se llevó a cabo en el laboratorio utilizando un refractómetro (HANNAInstruments, H198203), la cual se realizó de la siguiente manera; el refractómetro se introdujo en la muestra de agua de mar recolectada, y se registró la lectura del equipo, la cual se expresa en g/L. de NaCl (%= ppt).

### **Filtración**

El proceso de filtración se realizó "*in situ*", empleando para esto una bomba de gasolina (HONDA, WX10, Motor Co., Ltd. 2004), que permite el flujo de agua a través de una cápsula de filtración que contiene un filtro de polipropileno de una porosidad de 1  $\mu\text{m}$ , (Envirocheck HV, Pall Gelman Laboratory, 12099). La velocidad de flujo se ajustó a 2.0L/min y la presión a  $\leq 30$  psi después de filtración de la muestra, la cápsula

se desensambló del sistema de filtración y se transportó en una bolsa de plástico estéril, a una temperatura de 4°C hasta su traslado al Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (LMAA), Unidad Culiacán (CIAD) para su análisis, el cual se realizó dentro de las 24h a partir de la toma de la muestra.

### **Elución de la cápsula**

En la elución se utilizaron 250mL de buffer de elución (1g Laureth-12, 10mL de Solución Tris 1M, 2mL de EDTA, 2Na, pH 8.0 y 150µL de Antifoam A en 1L de agua destilada) por muestra. Se realizaron dos lavados a la cápsula, se tomaron 125mL de buffer para realizar el primer lavado, la cápsula se colocó en un agitador mecánico en posición horizontal con la válvula de aire en posición de las 12 (según las manecillas del reloj) a 900rpm por 5min. Después del tiempo de agitación, se transfirió el buffer de elución a tubos cónicos de polipropileno para centrifuga de 200mL. Posteriormente, se añadieron 125mL de buffer de elución restante a la cápsula, para realizar el segundo lavado, la cápsula se colocó de nuevo en el agitador mecánico con la válvula de aire en posición de las 3 (según las manecillas del reloj) por 5min. y posteriormente se movió a la posición de las 8 durante y se agitó por 5min., finalmente se transfirió el volumen de buffer a los tubos cónicos. La muestra contenida en los tubos cónicos se centrifugó a

1500 x g, durante 15min., en una centrifuga ventilada (Centra- CL3). Posteriormente se aspiró el sobrenadante con una pipeta por encima del pellet obtenido y se obtuvo un volumen de pellet de 5mL.

### **Purificación de la muestra (IMS)**

La purificación de la muestra se realizó por separación inmunomagnética (IMS). La IMS de ooquistes y quistes se realizó con el kit Dynal GC-Combo (Dynal Biotech, A.S., Oslo, Norway, 730.02) como lo recomienda el fabricante. A partir de la muestra concentrada del paso anterior se tomó 1mL de esta y se colocó en tubos de lado plano (L10 tubes, Dynal<sup>®</sup>, 740.03), a los que previamente se les añadió 1mL de la solución buffer A 10X, 1mL de la solución buffer B 10X y 7mL de agua destilada. A la mezcla anterior, se le agregaron 100µL de perlas contenidas en un vial de Dynabeads<sup>R</sup> Crypto-combo, (previa agitación para resuspender las perlas durante 10s) y 100µL de las perlas contenidas en un vial de Dynabeads<sup>R</sup> Giardia-combo (previa agitación). Posteriormente, se colocaron los tubos de lado plano en un mezclador rotatorio a 18rpm por 1h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de rotación, los tubos se colocaron en un concentrador magnético de partículas (Dynal, MPC<sup>®</sup>-1), verificando que el lado plano del tubo quedó de manera horizontal al lado del magneto. Posteriormente, se agitó suavemente de forma manual el tubo con el concentrador magnético de partículas, con

una inclinación aproximadamente de 90°, durante 2min. Después de mezclar, se colocó el MPC<sup>®</sup>-1 en posición vertical, y se decantó el sobrenadante, el tubo de lado plano en este paso se mantuvo dentro del concentrador magnético. Posteriormente, se retiró el tubo del concentrador magnético y se realizaron dos lavados; el primero con 1mL de buffer A-SL-1X y el segundo lavado con 0.5mL de agua destilada, se mezcló suavemente para resuspender todo el contenido del tubo y se transfirió su contenido en tubos de microcentrifuga de 1.5mL. El tubo de microcentrifuga se colocó en un segundo concentrador magnético de partículas (Dynal, MPC<sup>®</sup>-S, 120.20), y se mezcló manualmente durante 1min., con un ángulo de 180°. Al final de este paso las perlas se adhirieron a las paredes del tubo adyacentes al magneto, inmediatamente se aspiró el sobrenadante del tubo y se mantuvo el tubo dentro del concentrador magnético (MPC<sup>®</sup>-S). Posteriormente, se realizó la disociación de las perlas del complejo ooquistes y quistes. Se retiró el magneto del MPC<sup>®</sup>-S, y se le añadieron 50µL de HCl 0.1N, se agitó durante 50s y se dejó reposar 10min. a temperatura ambiente, posteriormente se colocó el tubo de microcentrifuga en el concentrador magnético, y se aspiró el sobrenadante que contiene los ooquistes y quistes, éste paso de disociación se repitió una vez más. A continuación, se prepararon portaobjetos con posillos (One Well Superstick Slides, Waterborne, S100-2) para realizar el estudio de la muestra y teñir. Se agregaron 5µL de NaOH 1.0N a los posillos y se añadieron 10µL de la muestra obtenida (sobrenadante) y las muestras se dejaron secar en una campana de flujo laminar por 1h y se almacenaron

a 4°C para su posterior tinción. Para la confirmación de las muestras por PCR, el volumen restante de la disociación ácida (muestra purificada), se le añadió un volumen igual de agua destilada a cada muestra y se conservaron a -20°C para su posterior análisis.

### **Tinción (Inmunofluorescencia)**

La muestra purificada fue teñida en un plazo de 72h después de la aplicación de esta a los portaobjetos. Se utilizó el kit de tinción A100FLK, Aqua-Glo™ G/C Direct (Waterborne™, Inc., New Orleans, LA, USA) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se prepararon controles positivos y negativos. Para los controles positivos se tomaron 10µL de antígeno positivo de ooquistes y quistes, en el centro de un posillo; para los controles negativos, se colocaron 50µL de PBS 150mM en el centro de un posillo y se dispersaron en toda el área con la punta de una pipeta. Posteriormente, se aplicaron 50µL de metanol absoluto a cada posillo que contenía la muestra seca y se dejó secar de 3 a 5min., en seguida a cada posillo, excepto al control negativo, se colocaron 50µL de anticuerpo monoclonal para *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. (Aqua Glo G/C Direct). Los portaobjetos se incubaron a 37°C por 30min. Después del tiempo de incubación se añadieron 50µL de buffer de lavado a cada posillo y posteriormente 50µL de la solución de tinción DAPI 1X (4'6-diamino-2-fenilindol), se

dejó reposar durante 1min. a temperatura ambiente, para fijar la muestra se añadieron 50µL de medio de montaje a cada posillo, y se cubrió con un cubreobjetos, se eliminó el exceso de fluido y selló el borde con esmalte de uñas, cuando las muestras no fueron examinadas inmediatamente, se almacenaron en una cámara húmeda oscura a una temperatura de 0 a 8°C, hasta su examinación.

### **Microscopía**

Se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Leica DME con un filtro de isotiocianato de fluoresceína), para observar los portaobjetos de las muestras teñidas a 40X. Los ooquistes de *Cryptosporidium* se identificaron por el tamaño de 4 a 6µm, de forma esférica y la fluorescencia verde manzana brillante. Los quistes de *Giardia* se identificaron por el tamaño de 8-18µm, forma ovalada y fluorescencia verde manzana brillante bajo la luz del microscopio de epifluorescencia.

### **Reporte de resultados**

La presencia de ambos protozoarios se reporta en número de microorganismos por cada 10 litros de agua de mar filtrada.

$$\frac{\text{Vol. de tinción (mL)}}{\text{Vol.de disociación (mL)}} \times \frac{\text{Vol. de pellet sujeto a IMS (mL)}}{\text{Vol. total de pellet (mL)}} \times \text{Litros filtrados}$$

### **Eficiencia de Recuperación del Método 1623**

Para realizar la eficiencia se utilizó una concentración stock de oo/quistes/mL y quistes/mL, las cuales se determinaron utilizando la cámara de Neubauer, para la concentración inicial con la siguiente formula:

$$\text{No. de oo/quistes/mL} = \frac{\text{No. de oo/quistes contados}}{\text{No. de mm}^2\text{contados}} \times \frac{10}{1\text{mm}} \times \frac{\text{Factor de dilucion}}{1} \times \frac{1000\text{mm}^3}{1}$$

Se prepararon concentraciones de 100-500 oo/quistes/mL y se inocularon en 10L de agua purificada, la cual fue procesada de acuerdo al método 1623 anteriormente descrito. El porcentaje de recuperación (R) se calculó de la siguiente manera:

$$R = \frac{\text{No. oo/quistes muestra inoculada} - \text{No. oo/quistes en muestra ambiental}}{\text{No. oo/quistes inoculados}} \times 100$$

### **Ooquistes de *Cryptosporidium parvum***

Los controles positivos de ooquistes fueron de *Cryptosporidium parvum* (cepa Iowa), obtenidos del Laboratorio de Parasitología del Dr. Sterling, de la Universidad de Arizona. Se prepararon concentraciones de 100-500 ooquistes/ml, para realizar los

controles utilizados en la eficiencia de recuperación y los controles positivos en las muestras para PCR.

### **Quistes de *Giardia lamblia***

Los controles positivos de quistes fueron de *Giardia lamblia* (cepa Portland) obtenidos del Laboratorio de Investigación en Parasitología, de la Dra. Enedina Jiménez Cardozo, del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". Se prepararon concentraciones de 100-500 quistes/ml, para los controles utilizados en la eficiencia de recuperación y los controles positivos en las muestras de PCR.



## Confirmación de las Muestras por PCR

### **Extracción de DNA**

A partir de la muestra purificada en la separación inmunomagnética se realizó la extracción de ADN de los ooquistes y quistes contenidos en la muestra, y la extracción de controles positivos para ambos protozoarios, se utilizó el kit QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (QIAGEN Inc., No. 51306) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se extrajo el ADN de oo/quistes del control positivo. Se tomaron 200µL de muestra en un tubo de microcentrífuga de 1.5mL y se añadieron 180µl de buffer ATL. Para provocar la lisis celular se sometió la mezcla anterior a 5 ciclos de congelado y descongelado (-70°C por 30min, en nitrógeno líquido y 56°C por 30min, en un baño de agua). Posteriormente, se añadieron 2µL de Proteinasa K, se mezcló en vórtex y se incubó a 56°C para completar la lisis durante 1.5h. Se mezcló con vórtex ocasionalmente durante la incubación. La muestra se centrifugó a máxima velocidad para remover gotas que pudieron haber quedado en el interior de la tapa. Se añadieron a la mezcla anterior 4µL de RNasa A (100mg/ml) y se mezcló con pulsos en vórtex durante 15s y se incubó por 2min. a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a máxima velocidad para remover las gotas de la tapa, posteriormente se añadieron 200µl de buffer AL a la muestra. Se mezcló de nuevo con pulsos vórtex por 15s y se incubó a 70°C por 10min. Se centrifugó de nuevo para remover las gotas de la tapa del tubo. Fue esencial que la muestra y el

buffer AL se mezclaran perfectamente para mantener una solución homogénea, ya que se formó un precipitado blanco con la adición de buffer AL, y se disolvió durante la incubación. Después del tiempo de incubación se añadieron 200µL de etanol (96-100%), y se mezcló de nuevo con pulsos en vórtex por 15s. Después de mezclar, se centrifugó brevemente. Fue esencial que la muestra, el buffer AL, y el etanol se mezclaran perfectamente para obtener una solución homogénea. Cuidadosamente se colocó la mezcla obtenida sobre la columna de Spin QIAamp (colocada en un tubo de 2mL), sin tocar las orillas de la membrana, se cerró la tapa y se centrifugó a 6000 x g (8000rpm) durante 1min. Después de centrifugar las columnas se colocaron sobre tubos nuevos de 2mL y se desechó el tubo que contiene el filtrado, cuando el lisado no pasó completamente a través de la columna después de la centrifugación, se centrifugó a máxima velocidad hasta que la columna se observara vacía. Cuidadosamente, se abrió la columna y se añadieron 500µL de buffer AW1 sin tocar los bordes de la membrana, se cerró la tapa y se centrifugó a 6000 x g (8000rpm) por 1min, posteriormente, se colocaron las columnas sobre tubos nuevos de 2mL y desechó el tubo de recolección que contenía el filtrado. Se añadieron 500µL de buffer AW2 sin tocar los bordes de la membrana y se centrifugó a máxima velocidad (20 000 x g; 14 000rpm) por 3min. Las columnas se colocaron sobre tubos limpios de 1.5mL y se desechó el tubo de recolección. Se añadieron 50µl de buffer AE y se incubó por 5min. a temperatura ambiente (15-25°C), posteriormente, se centrifugó a 6000 x g por 1min. para eluir el

ADN, y se realizó un segundo lavado de la membrana con 50µl de buffer AE por 5min., para aumentar la cantidad de ADN y se centrifugó a 6000 x g por 1min., para obtener un volumen de 100µl de elusión que contiene el ADN, las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

### **Confirmación de muestras positivas para *Cryptosporidium* spp. por PCR**

La PCR se realizó a partir del ADN extraído de cada una de las muestras que resultaron positivas después del método 1623 para confirmar la presencia de *Cryptosporidium* spp. Se extrajo ADN de ooquites purificados para utilizarlos como control positivo, y un control negativo sin ooquistes, se realizó la mezcla madre que se muestra en los Cuadros 7 y 8. Se utilizaron los primers que amplifican la región de 361 pb del gen *hsp 70* para *Cryptosporidium* spp. La secuencia de bases de cada uno de los primers (oligonucleótidos) se muestra en el Cuadro 6.

**Cuadro 6. Primers para Confirmación de *Cryptosporidium* spp. por PCR**

<b>Primer</b>	<b>Blanco</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Producto de PCR</b>
Cphsp 2423	Gen <i>hsp</i> 70	5'-AATGGTGAGCAATCCTCTG-3'	361 pb
Cphsp 2764		5'-CTTGCTGCTCTTACCAGTAC-3'	

Fuente: Rochelle y col., 1997a.

**Cuadro 7. Mezcla Madre de PCR para Primers Cphsp 2423 y Cphsp 2764**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Muestra	1 $\mu$ l
Buffer 1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	1.5mM
dNTP's	400 $\mu$ m
Primer 1	0.25 $\mu$ m
Primer 2	0.25 $\mu$ m
Taq Polimerasa	2.5U
Agua grado PCR	Variable
Vol. de reacción	50 $\mu$ l

Una vez realizada la mezcla madre se colocaron los tubos de PCR en un termociclador para llevar a cabo la amplificación del gen de interés bajo las siguientes condiciones (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Condiciones de Amplificación del Gen *hsp70* de un Tamaño de 361pb**

Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Cielos
95	60	1
95	30	
55	30	40
72	90	
72	300	1
4	300	

#### **Confirmación de muestras positivas para *Giardia* spp. por PCR**

La PCR se realizó a partir del ADN extraído de cada una de las muestras que resultaron positivas para confirmar la presencia de *Giardia* spp. Se extrajo ADN de quistes de *Giardia duodenalis* purificados para utilizarlos como control positivo y un control negativo sin quistes. Se realizó la mezcla madre que se muestra en el Cuadro 10. Se utilizaron los primers que amplifican la región de 171pb del gen de *giardina* para *Giardia* spp. la secuencia se muestra en el Cuadro 9.

**Cuadro 9. Primers para Confirmación de *Giardia* spp. por PCR**

<b>Primer</b>	<b>Blanco</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Producto de PCR</b>
GGL	<i>Gen giardina</i>	5'-AAGTGCCTCAACGAGCAGCT-3'	171 pb
GGR		5'-TTAGTGCTTTGTGACCATCGA-3'	

Fuente: Mahbubani y col., 1991a.

**Cuadro 10. Mezcla Madre de PCR para Primers GGR y GGL**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Muestra	1 µl
Buffer 1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM
dNTP's	200 µm
Primer 1	0.5 µm
Primer 2	0.5 µm
Taq Polimerasa	2.5 U
Agua grado PCR	Variable
Vol. de reacción	100 µl

Una vez realizada la mezcla madre se colocaron los tubos de PCR en un termociclador para llevar a cabo la amplificación del gen de interés bajo las siguientes condiciones (Cuadro 11):

**Cuadro 11. Condiciones de Amplificación del gen *giardina* de un Tamaño de 171pb**

Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
95	420	1
94	60	
57	60	40
72	180	
72	420	1
4	300	

#### **Electroforesis en gel de agarosa al 1%**

Los productos de PCR se visualizaron sobre un gel de agarosa al 1%. Se agregaron 0.3g de agarosa a 30mL de buffer TAE y se fundió en el horno de microondas a alta potencia (aproximadamente 40s), hasta que no se observaron cristales, se agregó 1µl de bromuro de etidio (10mg/mL) se mezcló con agitación manual. El gel se vació sobre la cámara de electroforesis, y se dejó polimerizar por aproximadamente 30min.

Los geles se corrieron a 90volts por 30min., con una fuente de poder (Termo EC105, 90 V), al primer pozo de cada gel se le añadió 5µl del marcador de peso molecular de 100pb (DNA Ladder, Promega) para el análisis de ADN y 1µl de colorante, en los siguientes pozo se cargaron, 10µl de producto de PCR de controles positivos y se le agregaron 2µl de colorante y en los siguientes pozos se colocaron 10µl del producto de PCR de las muestras más 2µl de colorante. Para visualizar los fragmentos de ADN amplificados se coloca el gel en un transluminador de UV y se registró la información con una cámara digital.



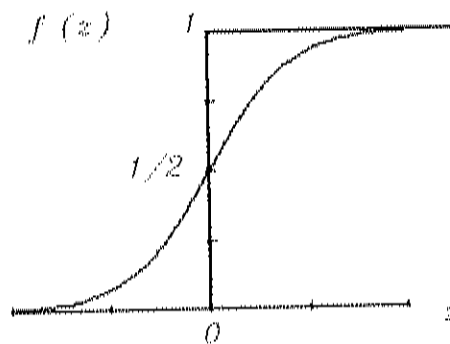
## DISEÑO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue dividido en dos partes: estadística descriptiva y Regresión Logística (predicción de riesgos). La parte descriptiva del estudio consistió en analizar el agua de mar en la Bahía de Altata y en Mazatlán, observando la presencia y cuantificación de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*. El análisis de resultados se muestra a través de un resumen gráfico y numérico.

La Regresión Logística se basa en la función matemática siguiente:

$$f(z) = \frac{1}{1 + e^{-z}} \quad (1)$$

denominada función logística, la cual tiene la gráfica siguiente:



**Fig. 3 Función Logística**

de donde se puede deducir que  $0 \leq f(z) \leq 1$  para  $-\infty \leq z \leq \infty$ .

Debido a su forma y a su rango, la función logística ha sido ampliamente utilizada en epidemiología para modelar la probabilidad de un evento de interés (Kleinbaum y Klein, 2002).

El modelo de regresión logística tiene la forma:

$$f(x_1, x_2, \dots, x_k) = \frac{1}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k}} \quad (2)$$

donde:  $x_1, x_2, \dots, x_k$  son las variables independientes bajo estudio y  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$  son términos constantes que representan parámetros desconocidos en el modelo. Los coeficientes de regresión  $\beta$  en el modelo logístico proveen información acerca de las interrelaciones entre las variables independientes y la variable dependiente.

Para una variable dicotómica  $Y$ , la cual toma los valores  $Y=1$  y  $Y=0$ , el modelo logístico adquiere la forma siguiente:

$$P(Y=1) = \frac{1}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k}} \quad (3)$$

El objetivo del modelo es estimar la mejor relación de las variables independientes, con la variable dependiente o predecir lo mejor posible la variable dependiente a través de las variables independientes (Kleinbaum y col., 1998).

Para estimar los parámetros del modelo, éste se transforma algebraicamente a la forma siguiente:

$$\text{Logit}(Y=1) = \ln \left[ \frac{P(Y=1)}{P(Y=0)} \right] = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2, \dots, \beta_k x_k \quad (4)$$

y se aplica el método de máxima probabilidad. La razón  $\left[ \frac{P(Y=1)}{P(Y=0)} \right]$  se denomina razón de momios (*odds ratio*) y se utiliza para comparar razones de riesgo para diferentes valores de los factores, como se ilustrará en la discusión de resultados. A partir del modelo *logit* anterior, la razón de momios puede expresarse, tomando antilogaritmos, mediante la ecuación:

$$\left[ \frac{P(Y=1)}{P(Y=0)} \right] = e^{\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2, \dots, \beta_k x_k} \quad (5)$$

En particular en este estudio el modelo de Regresión Logística utilizado fue:

$$P(\text{Pres}) = P(Y=1) = \frac{1}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 Tu + \beta_3 S}} \quad (6)$$

donde  $P(\text{Pres})$  es la probabilidad de riesgo de que el protozooario este presente.  $T$  es la variable Temperatura, los rangos que se presentaron en el estudio fueron de 19 a 36°C,  $Tu$  es Turbidez, con un rango de 2 a 5 NTU y  $S$  es Salinidad con un rango de 26 a 30 ‰

La forma *logit* del modelo para estimar los parámetros en el estudio:

$$\text{Logit}(\text{Pres}) = \ln \left[ \frac{P(Y=1)}{P(Y=0)} \right] = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 Tu + \beta_3 S \quad (7)$$

En la cual, la razón indica la probabilidad de la presencia de los oo/quistes sobre la probabilidad de ausencia.

$$\left[ \frac{P(Y=1)}{P(Y=0)} \right] = e^{\beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 Tu + \beta_3 S} \quad (8)$$

La razón de momios (*odds ratio*) es una medida que cuantifica el riesgo que representa poseer el factor correspondiente respecto a no poseerlo, suponiendo que el resto de las variables del modelo permanecen constante (Molinero, 2001). Por ejemplo el efecto de  $T$  de  $T_1$  a  $T_2$  ( $T_1 < T_2$ ), dejando fijos  $Tu$  y  $S$ , puede estimarse mediante el cociente de razón de momios:

$$\frac{\left[ \frac{P(Y=1)}{P(Y=0)} \right]_{T_2}}{\left[ \frac{P(Y=1)}{P(Y=0)} \right]_{T_1}} = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 T_2 + \beta_2 Tu + \beta_3 S}}{e^{\beta_0 + \beta_1 T_1 + \beta_2 Tu + \beta_3 S}} = e^{\beta_1(T_2 - T_1)} \quad (9)$$

Así el *odds ratio* supone pasar de  $X_1$  a  $X_2$ , siendo  $\beta$  el coeficiente correspondiente al factor en el modelo estadístico.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el paquete estadístico Minitab, Versión 14, realizando una Regresión Logística Binaria.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Presencia de Protozoarios

Se analizaron un total de 32 muestras de agua de mar de playas del estado de Sinaloa, 26 (81.25%) se detectaron positivas para ooquistes de *Cryptosporidium*, 21 (65.63%), fueron positivas para *Giardia* y la presencia de ambos protozoarios se detectó en 20 (62.5%) de las muestras analizadas. Las muestras incluyeron agua de mar de la Bahía de Altata (14) donde se tomaron muestras en dos zonas (Anexo 3) y Mazatlán (18), en donde se realizó el muestreo en tres zonas (Anexo 4).

Diversos estudios muestran su amplia distribución en el ambiente acuático de estos protozoarios, LeChevallier y col. (1991b), reportaron la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en 87% de aguas superficiales analizadas y 81% contenían la presencia de quistes de *Giardia* y el promedio de ambos protozoarios detectado fue de 97% de las muestras de agua, sin embargo, la comparación de datos debe realizarse con precaución debido a que las diferencias entre las metodologías empleadas, y el tipo de agua, demuestra que el reporte de la presencia de protozoarios puede variar. Wallis y col. (1996), en un estudio realizado en aguas residuales y aguas superficiales, encontraron mayor presencia de quistes de *Giardia* que ooquistes de *Cryptosporidium*, lo cual no coincide con nuestros resultados, ya que *Cryptosporidium* se detectó en mayor

concentración y con mayor frecuencia que *Giardia*. En un estudio realizado en nuestra región, Chaidez y col. (2005), detectaron la presencia en aguas superficiales utilizadas para riego, un 48% se detectaron positivas para ooquistes de *Cryptosporidium* y 50% fueron positivas para quistes de *Giardia*, la presencia de estos protozoarios en el ambiente, depende de varios factores ambientales y características de la población o región de estudio.

En las 14 muestras analizadas en la Bahía de Altata, 11 (78.57 %) se detectaron positivas para ooquistes de *Cryptosporidium* y en 8 (57.14 %) se detectó la presencia de quistes de *Giardia* y ambos protozoarios en 7 (50%) del total de muestras analizadas (Cuadro 12). Las 18 muestras analizadas en Mazatlán, en 15 (83.33%), se detectó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium*, 13 (72.22 %) fueron positivas para quistes de *Giardia* y ambos protozoarios en 13 (72.22%) (Cuadro 12).

Se observó una media de 593.75 ooquistes/10L (SD 654.48) en el total de muestras analizadas para *Cryptosporidium* en un rango de 150-2050 ooquistes/10L, mientras que *Giardia* se detectó con una media de 73.75 quistes/10L en un rango de 10-300 quistes/10L (SD 75.89) (Cuadro 13). El límite de detección para la presencia de ambos protozoarios en la muestras fue de 50 oo/quistes/10L, es decir, la mínima cantidad detectable fue de 5 oo/quistes/L.

**Cuadro 12. Porcentaje de Muestras que Contienen Ooquistes de *Cryptosporidium* y Quistes de *Giardia***

Playa	No. de muestras	Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> (%)	Quistes de <i>Giardia</i> (%)	Ambos protozoarios (%)
Altata	14	78.57	57.14	50
Mazatlán	18	83.33	72.22	72.22

**Cuadro 13. Rango y Promedio de Muestras Positivas para Ooquistes de *Cryptosporidium* y Quistes de *Giardia***

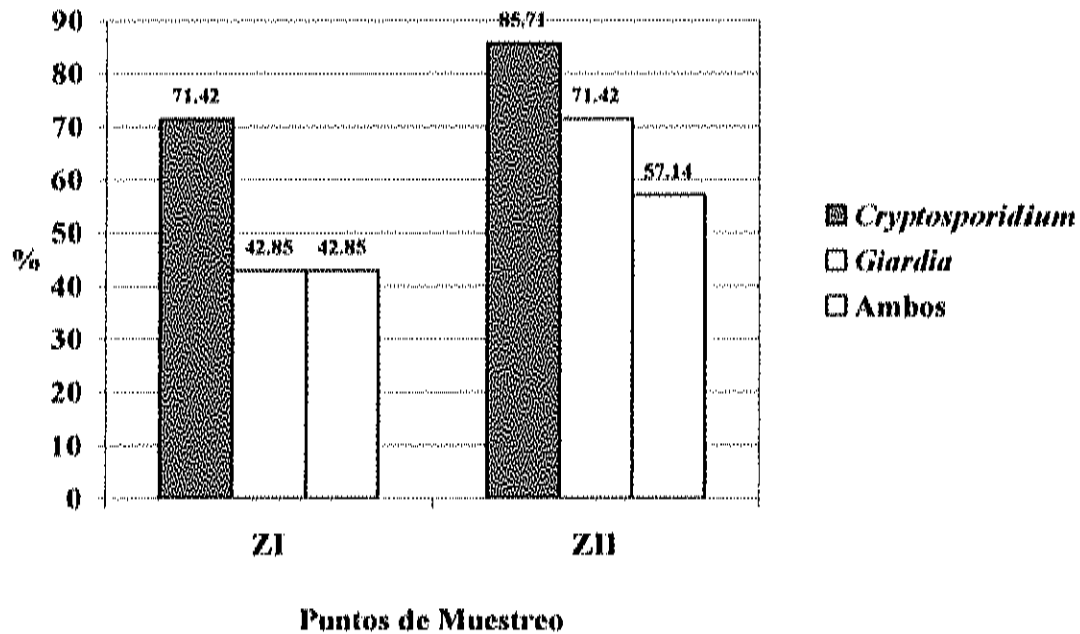
Protozoario (oo)quiste/10 L	Rango	Media	<sup>a</sup> SD
<i>Cryptosporidium</i>	150-2050	593.75	654.48
<i>Giardia</i>	10-300	73.75	75.89

<sup>a</sup>SD; Desviación estándar

*Cryptosporidium* y *Giardia* son protozoarios parásitos transmitidos por ambientes contaminados con ooquistes resistentes, excretados por huéspedes infectados (Marshall y col., 1997) y son la principal causa de brotes diarreicos por el uso de aguas recreativas (CDC, 2004). La mayoría de los brotes epidemiológicos en aguas recreativas son el resultado de la incorporación accidental de materia fecal por los usuarios que visitan ambientes de uso recreativo (Carpenter y col., 1999; Mathieu y col., 2004), la presencia de heces de ganado infectado y animales salvajes en lagos, canales y cuerpos de agua recreativa al aire libre o receptores de agua también contribuyen a la contaminación de estos ambientes (Slifko y col., 2000).

Las muestras analizadas de la Zona I en la Bahía de Altata (7), se detectaron 5 (71.42%) muestras positivas para ooquistes de *Cryptosporidium*, 3 (42.85%) para quistes de *Giardia* y 3 (42.85 %) fueron positivas para ambos protozoarios. Las muestras de la Zona II (7), se detectaron 6 (85.71%) positivas para ooquistes de *Cryptosporidium*, 5 (71.42%) positivas para quistes de *Giardia* y 4 (57.14%) para ambos protozoarios (Fig. 4).

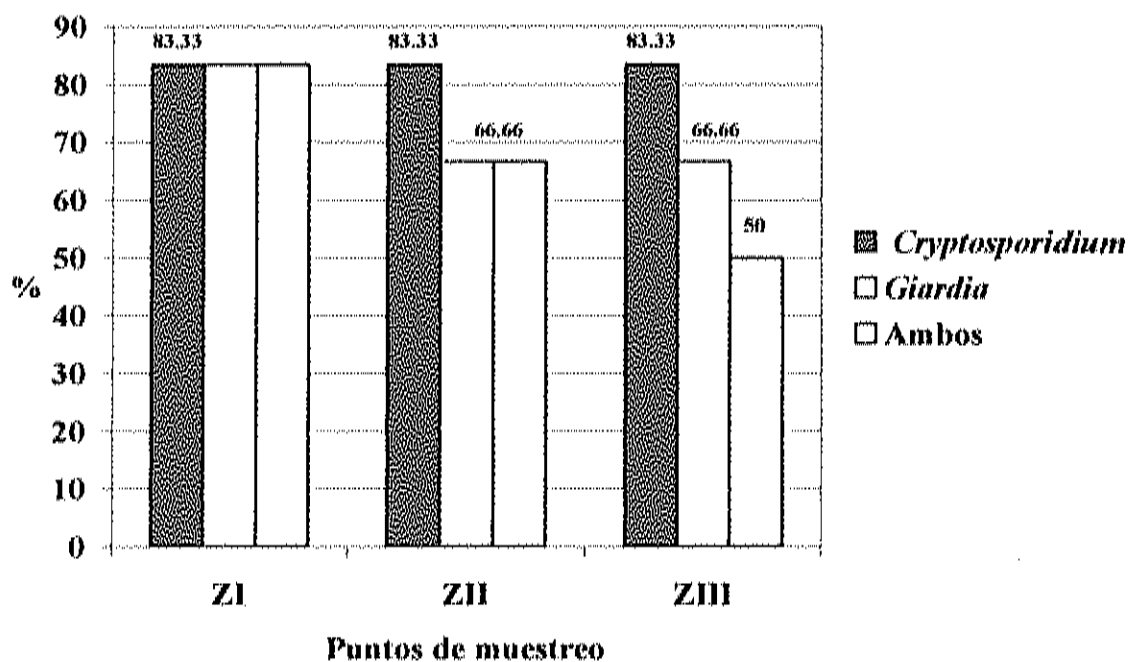




**Figura 4. Porcentaje de Muestras que Contienen Ooquistes de *Cryptosporidium* y Quistes de *Giardia* en la Bahía de Altata**

Se analizaron 6 muestras de cada una de zonas donde se realizaron los muestreos en Mazatlán; en la Zona I, se detectaron 5 (83.33%) muestras positivas para ambos protozoarios. En la Zona II, se detectaron 5 (83.33%) muestras positivas para ooquistes de *Cryptosporidium*, 4 (66.66%) positivas para quistes de *Giardia* y 4 (66.66%) para ambos protozoarios. En la Zona III, se detectaron 5 (83.33%) positivas para ooquistes de

*Cryptosporidium*, 4 (66.66%) para quistes de *Giardia* y 3 (50 %) para ambos protozoarios (Fig. 5).



**Figura 5. Porcentaje de muestras positivas para ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en Mazatlán**

De las playas evaluadas de la Bahía de Altata, la Zona II (Fig. 4), presentó mayor contaminación por ambos protozoarios (57.14%); en esta zona se observaron descargas de aguas residuales provenientes de granjas camaroneras e intercambio de aguas estuarinas. En las zonas evaluadas en Mazatlán, la Zona I (Fig. 7), presentó mayor contaminación por ambos protozoarios (83.33%); esta zona es de gran afluencia turística

extranjera y nacional y se realizan diversas actividades recreativas de contacto primario, así como también se observa una vía de descarga directa de aguas pluviales, que pueden transportar heces de animales domésticos y salvajes.

En un estudio realizado por Johnson y col. (1995), encontraron altas concentraciones de ooquistes de *Cryptosporidium* y *Giardia* en playas, que recibían descargas de aguas residuales cercanas al punto donde se realizaban actividades recreativas, estos resultados coinciden con lo observado en nuestro estudio, donde las descargas de aguas residuales son evidentes y pueden influir en la presencia de estos protozoarios. Ho y Tam, (1998), realizaron un estudio en playas recreativas en Hong Kong y detectaron la presencia de quistes de *Giardia* en un 41% de las muestras analizadas, en playas que se consideraban aptas para uso recreativo, clasificadas en base a la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal y en playas consideradas no aptas para uso recreativo, el 64% de las muestras contenían quistes de *Giardia*, las concentraciones detectadas fueron de 1-10 quistes/L y su presencia se relacionó directamente con la descarga de aguas residuales contaminadas, vertidas en grandes volúmenes en las zonas costeras. De acuerdo con los datos reportados por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2006) las playas evaluadas, en el presente estudio, son aptas para uso recreativo, tanto en la Bahía de Altata, como en Mazatlán, la calidad bacteriológica del agua de mar monitoreada por la Secretaría de Salud del estado, en noviembre de 2005 y de enero a junio de 2006, los

niveles de Enterococos se encuentran de  $\leq 10$  a 40NMP/100mL, lo cual de acuerdo a lo establecido en los lineamientos no se considera un riesgo sanitario para quienes están en contacto con estas aguas de uso recreativo (SEMARNAT, 2006)., a la par de nuestro estudio, se evaluó la presencia de Enterococos en el agua de mar y los niveles detectados en la Bahía de Altata (Anexo 5), en los meses de noviembre de 2005 y de enero a mayo de 2006, fueron de 15 a 105NMP/100mL (Vega y col., 2006), los niveles detectados fueron mayores a los reportados por SEMARNAT y aun cuando no se consideran un riesgo sanitario, si se detecta la presencia de ambos protozoarios y el mayor nivel de éstos indicadores se detectó en el mes de julio, 829 y 960NMP/100mL, para la Zona I y II respectivamente, mes en el cual no se detectó la presencia de ambos protozoarios. En Mazatlán, los niveles de Enterococos fueron de 12 a 278NMP/100mL, lo cual indica que no existe riesgo sanitario en estas zonas, sin embargo, si se detectó la presencia de ambos protozoarios. Estos resultados, coinciden con lo mencionado por Harwood y col. (2005), quienes mencionan que los microorganismos indicadores no se relacionan con la presencia directa de microorganismos patógenos como son *Cryptosporidium* y *Giardia*, frecuentemente se obtienen falsos negativos (indicadores ausentes pero patógenos presentes) o falsos positivos (indicadores presentes pero patógenos ausentes), como lo anteriormente mencionado.

La descarga de aguas residuales contaminadas con protozoarios, en aguas costeras pueden infectar a los humanos mientras realizan actividades recreativas (Fayer

y col., 2004) y su presencia a sido demostrada por diversos estudios. Gómez-Couso y col. (2005), evaluaron la presencia de quistes de *Giardia* en 37 muestras de descargas de aguas superficiales y aguas residuales que desembocan en aguas estuarinas donde se cultivan mejillones en las costas de España y detectaron la presencia de quistes de *Giardia* en 30 (81%) de las muestras analizadas de agua y 77 (41.8%) en los moluscos analizados, en una concentración promedio de 1-682 quistes/L y 1.4-3.3 quistes/4 $\mu$ l de mejillones obtenidas de 8 especímenes.

La concentración media de ooquistes de *Cryptosporidium* en la Bahía de Altata fue de 560.71 en un rango de 150-2050 ooquistes/10L y la concentración media de quistes de *Giardia* fue de 60.71, en un rango de 50-150 quistes/10L. La concentración media de ooquistes de *Cryptosporidium* en la Zona I fue de 557.14 ooquistes/ 10L y la concentración media de quistes de *Giardia* fue de 42.86 quistes/10 L. En la Zona II, la concentración media observada de *Cryptosporidium* fue de 564.29 ooquistes/10L y 78.57 quistes/10L de *Giardia* (Cuadro 14).

**Cuadro 14. Concentración Promedio de Ooquistes de *Cryptosporidium*/10L y Quistes de *Giardia*/10L en la Bahía de Altata**

Playa	Zona	<i>Cryptosporidium</i>	Rango <sup>a</sup>	<i>Giardia</i>	Rango <sup>b</sup>
Altata	I	557.14	150-2050	42.86	50-150
	II	564.29	250-1850	78.57	100-150

<sup>a</sup>Ooquistes/10L

<sup>b</sup>Quistes/ 10L

Las concentraciones detectadas durante el periodo de muestreo en la Bahía de Altata, la mayor concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* fue en el mes de enero en ambas zonas (2050 y 1850 ooquistes/10L, respectivamente); mientras que la menor concentración en la Zona I se observó en marzo y abril (150 ooquistes/10L), y en la Zona II la menor concentración se observó en marzo (250 ooquistes/10L) (Fig. 6). La mayor concentración detectada de quistes de *Giardia* se observó en el mes de abril en ambas zonas (150 quistes/10L) y la menor concentración en la Zona I se observó en noviembre (50 quistes/10L), mientras que en la Zona II la menor concentración se observaron en enero, febrero y marzo (100 quistes/10L) (Fig. 7).

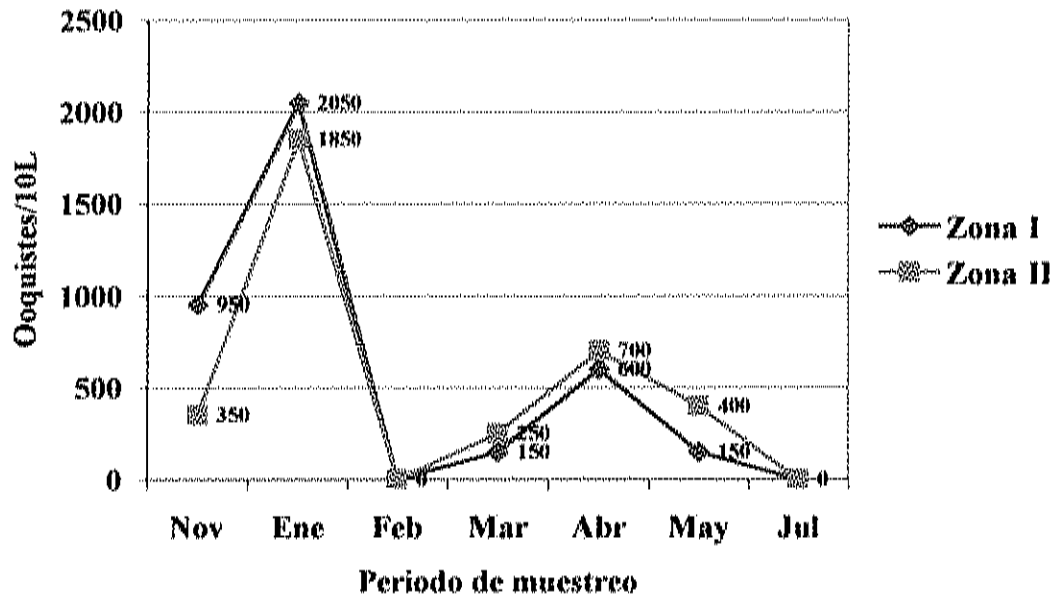
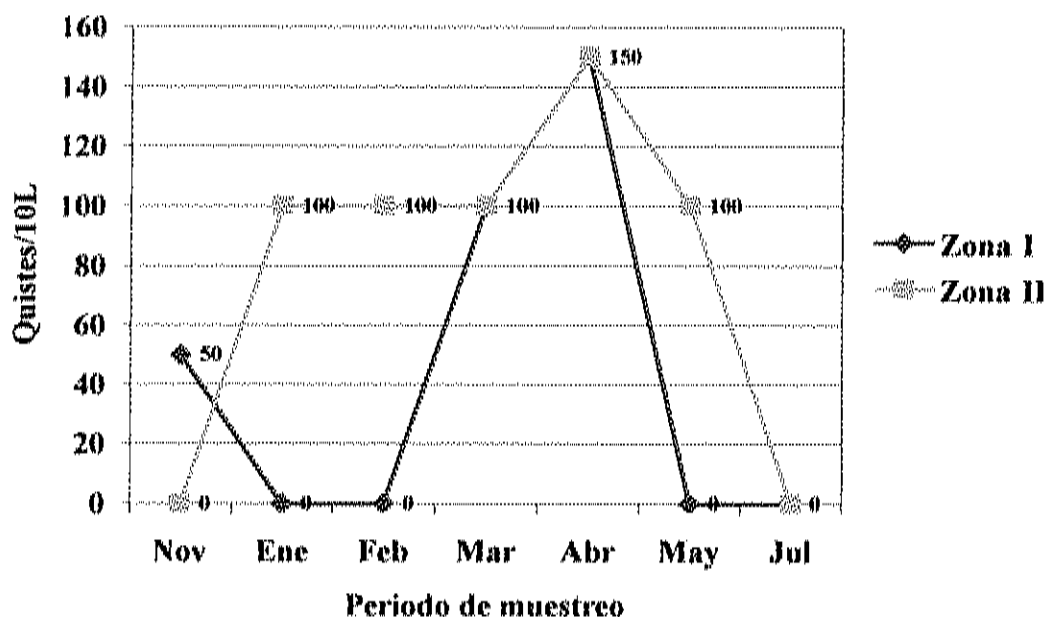


Figura 6. Presencia de Oocistos de *Cryptosporidium* en la Bahía de Altata



**Figura 7. Presencia de Quistes de *Giardia* en la Bahía de Altata**

La concentración media de ooquistes de *Cryptosporidium* en Mazatlán fue de 619 con un rango de 150-2000 ooquistes/10L, mientras que la media de quistes de *Giardia* fue de 84 con un rango de 10-300 quistes/10L. La concentración media de oo/quistes detectados en las Zona I, II y III, se encuentran descritas en el Cuadro 15, donde se observa que la Zona I, se detectó la mayor concentración de ambos protozoarios, *Cryptosporidium* con una media de 708.33 ooquistes/10L y *Giardia* 116.67 quistes/10L, con respecto a las otras zonas evaluadas.



**Cuadro 15. Concentración Promedio de Ooquistes de *Cryptosporidium* y Quistes de *Giardia*/10 L, en Muestras de Mazatlán**

Playa	Zona	<i>Cryptosporidium</i>	Rango <sup>a</sup>	<i>Giardia</i>	Rango <sup>b</sup>
Mazatlán	I	708.33	200-1700	116.67	50-300
	II	825	150-2000	91.67	100-200
	III	325	150-700	43.33	10-150

<sup>a</sup>Ooquistes/10 L

<sup>b</sup>Quistes/ 10 L

La mayor concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* en la Zona I de Mazatlán durante el periodo de muestreo se detectó en el mes de febrero (1700 ooquistes/10L), en la Zona II, en los meses de noviembre y febrero (2000 y 1850 ooquistes/10L respectivamente), y en la Zona III, la mayor concentración se detectó en noviembre (700 ooquistes/10L), mientras que las menores concentraciones de ooquistes se detectaron en el mes enero, en las Zonas I y II (200 y 150 ooquistes/10L) y en la Zona III se detectó en marzo (150 ooquistes/10L) (Fig. 8). La mayor concentración de quistes de *Giardia* detectada en la Zona I, fue durante el mes de febrero (300 quistes/10L), en la Zona II, fue en marzo (200 quistes/10L) y en la Zona III, en abril (150 quistes/10L). La menor concentración en la Zona I se detectó en los meses de enero y marzo (50

quistes/10L), mientras que en la Zona II, fue noviembre y febrero (1000 quistes/10L) y en la Zona III, fue en noviembre, febrero y julio (50 y 10 quistes/10L) (Fig.9).

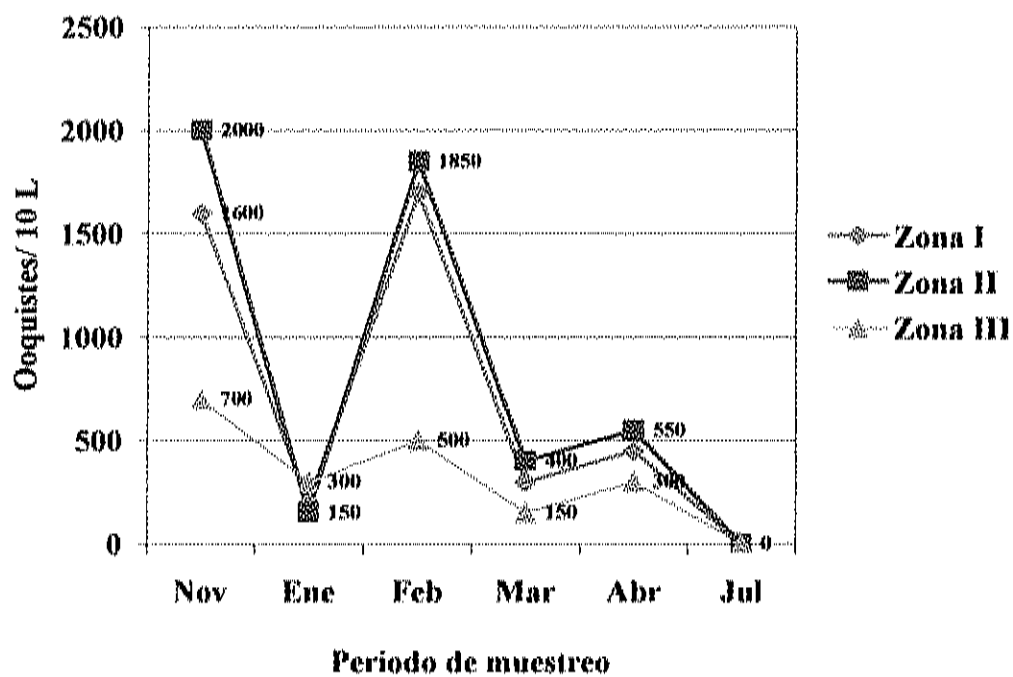


Fig. 8 Presencia de Ooquistes de *Cryptosporidium* en Mazatlán

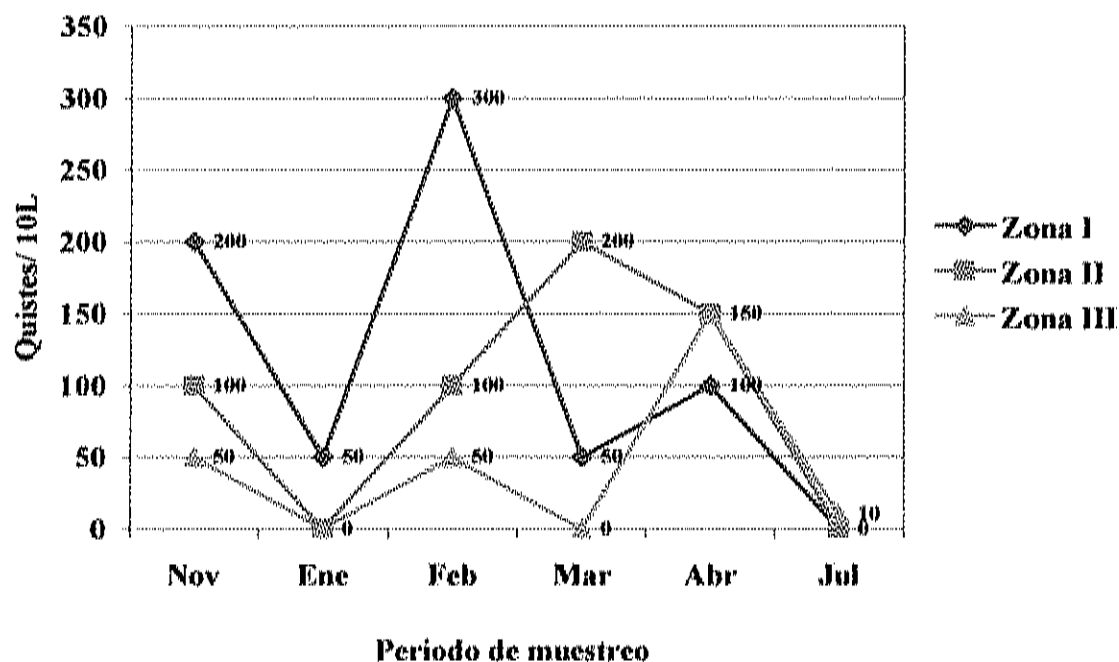


Figura 9. Presencia de Quistes de *Giardia* en Mazatlán

Diversos estudios han reportado la distribución de ooquistes de *Cryptosporidium*, en diferentes estaciones del año, LeChevallier y col. (2003), observaron aumentos en la frecuencia de detección de ooquistes en el otoño y en la primavera, utilizando el método 1623, estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro estudio, donde la mayor concentración de ooquistes detectados en ambas playas, se observó en los meses de otoño-invierno (enero-febrero) y primavera (marzo-abril). Otros estudios también observan distribuciones similares en los meses más frescos del año. Ong y col. (1996), observaron mayor concentración de quistes de *Giardia* en los meses de invierno con

concentraciones de 1-200 quistes/100L y la concentración mayor de ooquistes de *Cryptosporidium* la observaron en la primavera, con una concentración de 300 ooquistes/100L, cuando analizaron muestras de reservorios de agua mensualmente.

La eficiencia para detectar ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* reportada para el método 1623 es mayor a los métodos anteriormente empleados (EPA, 2001). Quintero-Betancourt y col. (2003), reportaron una eficiencia de 75% (RSD 16%) para ooquistes de *Cryptosporidium* y 55% (RSD 22%) para la detección de quistes de *Giardia*, cuando evaluaron la eficiencia en agua purificada inoculada con ambos protozoarios. Estos datos coinciden con la eficiencia obtenida en el presente estudio, donde se obtuvo una eficiencia de recuperación de 98.38% (RSD 2.9%), para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* y 29.37% (RSD 24.55%) de eficiencia para detectar quistes de *Giardia*, el límite de detección obtenido fue de 1.6-3.3 ooquistes/10L y 3.3 quistes/10L, lo cual indica que bajo las condiciones de laboratorio en las que se trabajo el método se encuentran dentro del criterio de aceptación del método (EPA, 2001).

Sin embargo, se ha reportado que la eficiencia de detección del método 1623, varía dependiendo del tipo de agua que se esta analizando, en el estudio realizado por Quintero-Betancourt y col. (2003), analizaron la eficiencia de recuperación en aguas tratadas de rehúso, y la eficiencia reportada para ooquistes de *Cryptosporidium* varía de 1-84% (32 ± 97%) con niveles detectables de 2-209 ooquistes/100L, y para *Giardia* la

eficiencia varía de 1-68% ( $27 \pm 94\%$ ), y los niveles detectables fueron entre 13-118 quistes/100L, por lo que es necesario que cada laboratorio evalúe la eficiencia del método antes de ser empleado en muestras ambientales. La turbidez es uno de los factores que se ha reportado afecta la eficiencia del método, principalmente durante la filtración. DiGorgio y col. (2002) obtuvieron una eficiencia de recuperación para *Cryptosporidium* de 36 a 75% y 0.5 a 53% para *Giardia*, cuando la evaluaron en muestras ambientales con niveles de turbidez entre 11 y 99NTU, y mencionan que a niveles bajos de turbidez (11 NTU) la eficiencia de recuperación para ambos protozoarios es mayor que a niveles altos de turbidez, en el presente estudio los niveles de turbidez en las muestras de agua de mar se encontró entre 2 y 5NTU (Cuadro 16), por lo que los niveles detectables de ooquistes se relacionan con una eficiencia de recuperación aceptable.

El método 1623 detecta ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* viables y no viables, en este estudio no se determinó la viabilidad de estos protozoarios detectados en las muestras; sin embargo, estudios previos han determinado la viabilidad de *Cryptosporidium* y *Giardia*, en muestras ambientales acoplando el método 1623 a cultivo celular y técnicas moleculares. LeChevallier y col. (2003), detectaron la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en 60 de 593 (10.1%) por el método 1623, en muestras analizadas en ríos de Estados Unidos, el promedio de las concentraciones fueron  $<0.001$  a 0.069 ooquistes/L y de las 60 muestras positivas 22 (37%), fueron

detectadas viables e infectivas por la técnica de cultivo celular y PCR, estos resultados sugieren que la mayoría de los ooquistes detectados pueden ser viables e infectivos, significando con ello un posible riesgo a la salud de quienes están en contacto con agua contaminada.

La concentración de oo/quistes en el ambiente aún en bajas concentraciones pueden significar un riesgo potencial a la salud de quienes visitan las playas y se introducen al mar, ya que, la forma de adquirir la infección por estos patógenos es a través de la ingestión. Dufour y col. (2006), realizaron un estudio empírico para determinar la cantidad de agua ingerida por personas durante las actividades recreativas, y concluyeron que los adultos (mayores de 18 años) ingirieron de 0 a 53 mL de agua y adultos menores (menores de 18 años) ingirieron mayor cantidad de 0 a 154 mL, durante el baño en una alberca pública, en un periodo de 45 minutos, y mencionan que este tipo de comportamiento puede no ser observado en aguas de mar, donde los periodos de inmersión pueden variar, sin embargo, en base a estos resultados, podemos estimar que el usuario ingiere alrededor de 100mL de agua, los cuales pueden contener concentraciones de oo/quistes que ocasionen una infección, en el presente estudio se detectaron concentraciones de 60 ooquistes/1L (6 ooquistes/100mL) y 7 quistes/1L (1 quistes/100mL), asumiendo que los oo/quistes se encuentren viables y, tomando en cuenta la dosis infecciosa de 10 ooquistes (Tay, 1995) y de 10 a 100 quistes (Bitton, 1994) el riesgo de infección puede ser elevado.

Los resultados obtenidos de la medición de los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH, salinidad, turbidez) del agua de mar, se muestran en el Cuadro 16, algunos de ellos presentaron variaciones entre las estaciones del año, la temperatura del agua fue de 19 a 36°C, con una media de 25°C, la salinidad fue de 26-32‰, con una media de 30‰, el pH fue de 7.08 a 8.06, con una media de 8 y la turbidez fue de 2.7-3.8NTU, con una media de 3.2NTU.

**Cuadro 16. Calidad del Agua en los Puntos de Muestreo**

Parámetro	Altata		Mazatlán		
	Zonas				
	I	II	I	II	III
Temperatura (°C)	20-32	19-33	19-30	20-31	21-36
pH	8.06	8.16	8.05	7.8	7.8
Salinidad (‰=mg/L)	26	32	30	28	28
Turbidez (NTU)	2.7	2.7	3.04	3.8	3.9

### Modelo de Regresión Logística (Predicción de Riesgos)

#### **Predicción de riesgo para *Cryptosporidium***

##### *Modelo Logístico*

El Cuadro 17 muestra, para cada parámetro de la función de regresión logística, el valor estimado, el error estándar del estimador, el valor del estadístico de prueba (Z) (para la significancia de cada parámetro) y su correspondiente valor p. Así mismo contiene la razón de momios (*odds ratio*) y su intervalo de confianza del 95%

**Cuadro 17. Análisis Logístico para la Presencia de Ooquistes de *Cryptosporidium***

Estimador	Coeficiente	SE Coeficiente	Z	P	<i>Odds Ratio</i>	95% CI	
						Mín.	Máx.
Constante	0.649202	4.96754	0.13	0.896			
Temperatura	-0.276501	0.131573	-2.10	0.036	0.76	0.59	0.98
Turbidez	1.08300	0.725318	1.49	0.135	2.95	0.71	12.24
Salinidad	0.162884	0.187508	0.87	0.385	1.18	0.81	1.70



En presente estudio, de acuerdo al análisis de regresión logística para predecir el riesgo de presencia/ausencia de ooquistes de *Cryptosporidium*, la variable temperatura tiene efecto significativo ( $p= 0.036$ ) y las variables turbidez y salinidad no resultaron estadísticamente significativas ( $p= 0.135$  y  $0.385$ , respectivamente). Esto último, puede explicarse por la limitación en el tamaño de muestra (Cuadro 17).

La variable temperatura y la turbidez, aún cuando esta última no muestra un efecto estadísticamente significativo, se incluyeron en el análisis de resultados para predecir riesgos. El modelo logístico estimado fue:

$$P(\text{Pres}) = \frac{1}{1 + e^{-0.28T + 1.083Tu}}$$

El estimador de la variable temperatura muestra un valor negativo (-0.28) y su razón de momios es 0.76, lo cual implica que aumentos en la variable causarán disminuciones en la probabilidad de presencia, es decir, el riesgo de ausencia estimado es 1.32 ( $1/0.76$ ) veces el riesgo de presencia. El estimador de la variable turbidez muestra un valor positivo (1.083) y su razón de momios es 2.95, es decir, el riesgo de presencia es 2.95 veces el riesgo de ausencia, lo cual implica que aumentos en la turbidez causarán incremento en la probabilidad de presencia. Los resultados muestran que al aumentar en un grado la variable temperatura existe menor riesgo de presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* y existe un mayor riesgo al aumentar en un grado la variable turbidez.

### *Efecto de la Temperatura*

Por otro lado, para fines prácticos se calcularon los cocientes de razones de momios, para estimar el efecto de la temperatura entre valores de 19 y 36°C, aplicando la Formula 9 (pp. 79).

$$\frac{\left[ \frac{P(\text{Pre})}{P(\text{Au})} \right]_{36}}{\left[ \frac{P(\text{Pre})}{P(\text{Au})} \right]_{19}} = e^{-0.28(36-19)} = e^{-4.7} = 0.009$$

O equivalentemente,

$$\frac{\left[ \frac{P(\text{Pre})}{P(\text{Au})} \right]_{19}}{\left[ \frac{P(\text{Pre})}{P(\text{Au})} \right]_{36}} = \frac{1}{0.009} = 111.1$$

Este cociente de razón de momios indica que, el riesgo de encontrar ooquistes de *Cryptosporidium* a una temperatura de 19°C es alrededor de 111 veces el riesgo de encontrarlo a 36°C; lo cual implica un mayor riesgo de encontrar ooquistes de *Cryptosporidium* a temperaturas bajas.

Se ha reportado por varios estudios, que ooquistes de *Cryptosporidium* se mantienen infectivos, y se encuentran presentes por más tiempo a temperaturas entre 10 y 20°C y a temperaturas mayores, 30-35°C, su infectividad se ve disminuida y por lo

tanto su presencia disminuye. En un estudio realizado por Fayer y col. (1998b), almacenaron ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en agua desionizada a diferentes temperaturas y evaluaron su infectividad en ratones; los ooquistes almacenados a 5, 10 y 15°C fueron infectivos por 24 semanas, a 25 y 30°C, 12 semanas y a 35°C, 1 semana. Aplicando estos antecedentes a los resultados obtenidos en nuestro análisis, temperaturas entre 24 y 36°C, observadas en nuestro estudio, durante las estaciones de primavera-verano, la presencia de ooquistes fue menor y por lo tanto, podemos concluir que retienen su infectividad por menos tiempo, mientras que a temperaturas entre 19-22°C observadas durante el otoño-invierno, la presencia de ooquistes fue mayor, por lo que pueden permanecer por más tiempo infectivos e implican un riesgo a la población expuesta.

La capacidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* para iniciar la infección se ha ligado a reservas de energía en forma de amilopectina, la cual es consumida en respuesta directa a aumentos en las temperaturas ambientales (Fayer y col., 1998b). King y col. (2005), observaron mayores porcentajes de inactivación de ooquistes incubados a temperaturas mayores de 15°C, y sugieren que la temperatura es el principal factor abiótico que afecta la sobrevivencia e infectividad de los ooquistes en el ambiente y provoca aumento en la actividad metabólica de los ooquistes, lo que hace que agoten sus reservas de energía.

### *Efecto de la Turbidez*

Para estimar el efecto de la turbidez, se analizó entre valores de 2 y 5 NTU, aplicando una expresión para turbidez similar a la Formula 9 (p. 79).

$$\frac{\left[ \frac{P(\text{Pre})}{P(\text{Au})} \right]_5}{\left[ \frac{P(\text{Pre})}{P(\text{Au})} \right]_2} = e^{1.083(5-2)} = e^{3.25} = 25.79$$

Este cociente de razón de momios indica que el riesgo de encontrar ooquistes de *Cryptosporidium* a 5 NTU es alrededor de 26 veces el riesgo de encontrarlos a 2 NTU; lo cual implica un mayor riesgo de encontrar ooquistes de *Cryptosporidium* a turbidez altas.

La turbidez en el agua es causada por la presencia de partículas suspendidas o impurezas que interfieren con la claridad del agua, estas impurezas pueden incluir tierra, arena, cieno, materia orgánica e inorgánica finamente dividida, plancton y otros organismos microscópicos (APHA, 1999). La turbidez puede proveerle a los microorganismos patógenos presentes en el agua, protección y alimentación. Aún cuando la turbidez no es un indicador directo de riesgo a la salud, diversos estudios demuestran la relación que existe entre la eliminación de turbidez y la eliminación de protozoarios (EPA, 1999). LeChevallier y col. (1991a), observaron la relación de la

turbidez y la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua potable cuando es sometida a procesos de filtración para mejorar la calidad del agua y muestran que aún cuando la turbidez del agua es baja no aseguraban que el agua analizada estuviera libre de ooquistes, por lo que al relacionarlo con nuestro estudio, podemos concluir que a turbidez mayor de 2NTU, existe un mayor riesgo de presencia de ooquistes, por que al adherirse a las partículas en suspensión los protege de las condiciones ambientales adversas. Por otro lado, King y col. (2005), mencionan que la inactivación o la sobrevivencia de ooquistes no es afectada por el tipo o la calidad del agua, que se relacionan con la turbidez y el contenido de coliformes fecales. Medema y col. (1998) mencionan que los ooquistes se adhieren a las partículas en suspensión y dependiendo del tamaño de partícula, los ooquistes se sedimentan o permanecen en la superficie del agua.

La salinidad no mostró efecto significativo en el riesgo de presencia/ausencia de *Cryptosporidium*, pero diversos estudios demuestran que se encuentran presentes en ambientes salinos y son infectivos por largos periodos. Johnson y col. (1995), reportaron que ooquistes de *Cryptosporidium* a 35‰ de salinidad, pueden permanecer viables de 3 a 4 días a temperatura ambiente. Freire-Santos y col. (1999) observaron que ooquistes permanecían infectivos por 40 días a 35‰ de salinidad a una temperatura de 18°C. La salinidad medida en nuestro estudio, se encuentra entre 26-32‰, por lo que al comparar con los estudios realizados se observa que la salinidad no afecta la infectividad de los

ooquistes, si no es la temperatura la que influye directamente en la disminución de su infectividad. Bioensayos en ratones indican que los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* permanecen infecciosos por 2 semanas cuando son almacenados a 30‰, a una temperatura de 20°C y almacenados a 10°C permanecen infectivos hasta 12 semanas, estos resultados sugieren que los ooquistes pueden sobrevivir en aguas saladas por largo tiempo y también observaron que pueden ser removidos por filtradores como son las ostras y otros bivalvos y servir como vectores de éste patógeno (Fayer y col., 1998a). Gomez-Bautista y col. (2000), detectaron la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en mariscos de algunas zonas de la costa española y su presencia de relaciona con las descargas de aguas de ríos cercanas a los puntos de muestreo.

Algunos factores (temperatura, salinidad, turbidez, periodo de lluvia, intensidad de la luz), que contribuyen a la presencia de los protozoarios en el agua han sido evaluados y hacen posible la estimación de riesgos relacionados con el uso del agua para recreación, agua de consumo o en productos marinos que se consumen crudos (Fayer y col., 2000).

#### *Predicción de Riesgos en Condiciones Ambientales*

A partir del modelo logístico estimado, se calcularon los riesgos de presencia a diferentes temperaturas y turbidez, con los valores de éstas variables observados durante el muestreo, utilizando el modelo logístico (Cuadro 18).

**Cuadro 18. Predicción de Riesgos de Presencia de Ooquistes de *Cryptosporidium***

(Temperatura <sup>a</sup> , Turbidez <sup>b</sup> )	Riesgo
(19,3)	0.89
(25,4)	0.94
(27,4)	0.96
(36,5)	0.99

<sup>a</sup>Temperatura °C  
<sup>b</sup>Turbidez NTU

Si bien, la interacción temperatura-turbidez no fue incluida en el modelo, por la limitación en el tamaño de muestra, en el Cuadro 18, se observa que existe un efecto de interacción entre la temperatura y la turbidez. De acuerdo al modelo, los riesgos esperados por el efecto de la temperatura, deberían disminuir al incrementarse la temperatura; sin embargo, se observa que el riesgo aumenta al incrementar la turbidez, la cual, en el agua aumenta cuando la cantidad de materia orgánica e inorgánica en suspensión aumenta y el movimiento del agua provoca que se encuentren suspendidas por más tiempo, por lo que el riesgo de encontrar ooquistes de *Cryptosporidium* puede aumentar, aun cuando la temperatura es mayor, la cual se presenta en épocas del año caluroso y donde la presencia de lluvias, provoca el arrastre de materiales hacia las

zonas costeras y al unirse los ooquistes a las partículas en suspensión estas le confieren protección (EPA, 1999), por lo que el riesgo puede ser mayor a estas condiciones.

### **Predicción de riesgo para *Giardia***

#### *Modelo Logístico*

El Cuadro 19 muestra, para cada parámetro de la función de regresión logística, el valor estimado, el error estándar del estimador, el valor del estadístico de prueba (Z) (para la significancia de cada parámetro) y su correspondiente valor p. Así mismo contiene la razón de momios (*odds ratio*) y su intervalo de confianza del 95%

**Cuadro 19. Análisis Logístico para la Presencia de Quistes de *Giardia***

Estimador	Coeficiente	SE Coeficiente	Z	P	Odds Ratio	95% CI	
						Min.	Máx.
Constante	-4.91090	4.96685	-0.99	0.323			
Temperatura	-0.304158	0.131818	-2.31	0.021	0.74	0.57	0.96
Turbidez	2.25607	0.896847	2.52	0.012	9.55	1.65	55.36
Salinidad	0.220485	0.173993	1.27	0.205	1.25	0.89	1.75



De acuerdo al análisis de regresión logística, para predecir el riesgo de presencia/ausencia de quistes de *Giardia*, la variables temperatura y turbidez tienen efecto estadísticamente significativo ( $p= 0.021$  y  $0.012$ , respectivamente), la variable salinidad no resultó estadísticamente significativa ( $p=0.205$ ) (Cuadro 19).

La variable temperatura y turbidez, se presentan en el análisis de resultados para predecir riesgos. El modelo logístico estimado fue:

$$P(\text{Pres}) = \frac{1}{1 + e^{-0.30T + 2.26Tu}}$$

El estimador de la variable temperatura muestra un valor negativo (-0.30) y su razón de momios es 0.74, lo cual implica que aumentos en la variable causarán disminuciones en la probabilidad de presencia, es decir, el riesgo de ausencia estimado es de 1.35 ( $1/0.74$ ) veces el riesgo de presencia. El estimador de la variable turbidez muestra un valor positivo (2.26) y su razón de momios es 9.55, decir el riesgo de presencia es 9.55 veces el riesgo de ausencia, lo cual implica que aumentos en la variable causarán aumentos en la probabilidad de presencia. El análisis muestra que al aumentar en un grado la variable temperatura existe menor riesgo de presencia de quistes de *Giardia* y existe un mayor riesgo al aumentar en un grado la variable turbidez.

### *Efecto de la Temperatura*

Se calcularon cocientes de razones de momios para estimar el efecto de la temperatura entre valores de 19 y 36°C, aplicando la forma estimada de la Formula 9 (pp.79).

$$\frac{\left[ \frac{P(\text{Pre})}{P(\text{Au})} \right]_{36}}{\left[ \frac{P(\text{Pre})}{P(\text{Au})} \right]_{19}} = e^{-0.3(36-19)} = e^{-5.16} = 0.0056$$

o equivalentemente:

$$\frac{\left[ \frac{P(\text{Pre})}{P(\text{Au})} \right]_{19}}{\left[ \frac{P(\text{Pre})}{P(\text{Au})} \right]_{36}} = \frac{1}{0.0056} = 178.6$$

El cociente de razón de momios, indica que el riesgo de encontrar quistes de *Giardia* a una temperatura de 19°C es 178 veces el riesgo de encontrarlo de 36°C, es decir, existe mayor riesgo de encontrar quistes de *Giardia* a temperaturas bajas.

Algunos estudios demuestran que quistes de *Giardia lamblia* pueden sobrevivir almacenados en agua, a 8°C por 77 días, pero su sobrevivencia disminuye cuando la temperatura aumenta, 5 a 24 días a 21°C y a 37° C, 4 días y los quistes que son expuestos a ebullición pierden inmediatamente su capacidad infectiva (Bingham y col., 1979). deRegnier y col. (1989), observaron que quistes de *Giardia muris* permanecían viables

por 2.8 meses almacenados en agua de río, a una temperatura <10°C y aproximadamente un mes cuando eran almacenados entre 15-20°C en agua de lago. De acuerdo a lo ya reportado, nuestro análisis muestra que existe mayor riesgo de presencia de quistes de *Giardia* en épocas donde las temperaturas son bajas, las cuales se observaron en otoño-invierno (19-24°C) y menor concentración de quistes se presentaron en los meses de primavera-verano (27-36°C).

#### *Efecto de la Turbidez*

Para estimar el efecto de la turbidez, se analizó entre valores de 2 y 5 NTU, aplicando una expresión para turbidez similar a la Formula 9 (pp. 79).

$$\frac{\left[ \frac{P(\text{Pre})}{P(\text{Au})} \right]_5}{\left[ \frac{P(\text{Pre})}{P(\text{Au})} \right]_2} = e^{2.256(5-2)} = e^{6.76} = 869.7$$

Este cociente de razón de momios indica que el riesgo de encontrar quistes de *Giardia* a 5 NTU es alrededor de 870 veces el riesgo de encontrarlos a 2 NTU; lo cual implica un mayor riesgo de encontrar quistes de *Giardia* a niveles de turbidez altas.

LeChevallier y col. (1991b), encontraron una correlación significativa entre la concentración de oo/quistes y parámetros de calidad del agua, como son turbidez y la

concentración de bacterias coliformes, concluyen que aumentos en los niveles de contaminación (altas concentraciones de bacterias coliformes fecales y totales y altos niveles de turbidez) representan un aumento en la probabilidad de que *Giardia* y *Cryptosporidium* se encuentren presentes a altas concentraciones. En contraste, Isaac-Renton y col. (1996), realizaron un estudio en agua superficial, la media de turbidez fue de 0.4-2.6NTU, y analizaron su correlación con la concentración de quistes, pero la concentración mayor no se relacionó con la concentración mayor de quistes detectados, por lo que se sugiere, que esto depende de la calidad y fuente del agua, que los quistes se encuentren presentes y su relación con la turbidez sea positiva.

La salinidad no mostró efecto significativo en riesgo de presencia/ausencia de *Giardia*, aunque algunos estudios muestran que *Giardia muris*, puede permanecer viable a una salinidad de 35ppt, hasta 3h en presencia de luz (Johnson y col., 1997). La salinidad parece jugar un papel importante en la inactivación de *Giardia muris*, los quistes que se mantuvieron a 35ppt fueron inactivados más rápidamente que los que se mantuvieron a 28ppt y se observó al microscopio en los quistes hiperplasmólisis, el contenido de los quistes disminuía dentro del quiste, por la salida del agua debido al ambiente hipertónico fuera del quistes. La salinidad y la luz solar inactivan a los quistes de *Giardia* debido a que se daña la permeabilidad de la pared celular (Johnson y col., 1997). Johnson y col. (1995), sugieren que los oo/quistes originados de fuentes recientes

(descargas de aguas residuales) pueden permanecer viables cuando se encuentran presentes en agua de mar.

#### *Predicción de Riesgos en Condiciones Ambientales*

A partir de los datos anteriores, se calcularon los riesgos de presencia a diferentes temperaturas y turbidez, con los valores observados durante el muestreo, utilizando el modelo logístico (Cuadro 20).

**Cuadro 20. Predicción de Riesgos de Presencia de Quistes de *Giardia***

(Temperatura <sup>a</sup> , Turbidez <sup>b</sup> )	Riesgo
(19,3)	0.25
(20,3)	0.31
(25,4)	0.17
(30,4)	0.49
(36,5)	0.38

<sup>a</sup>Temperatura °C

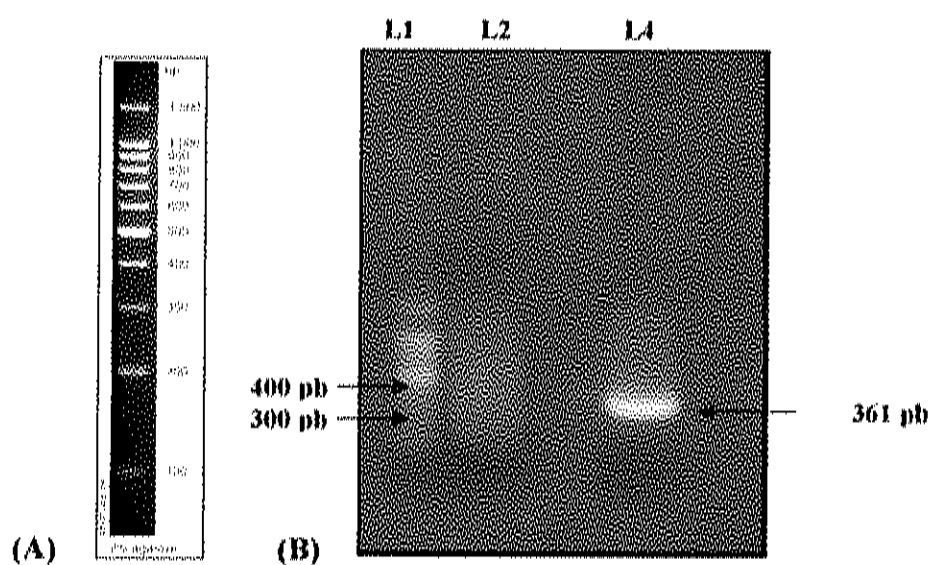
<sup>b</sup>Turbidez NTU

La interacción temperatura-turbidez no fue incluida en el modelo, por la limitación del tamaño de muestra, en el Cuadro 20, se observa que existe un efecto de interacción entre estas variables. Se observa que al aumentar la temperatura el riesgo de

presencia de quistes disminuye, sin embargo a 30°C y 4NTU el riesgo aumenta, esta combinación se observó en el análisis descriptivo durante el verano, donde la turbidez aumenta por la cantidad de materia orgánica e inorgánica que es transportada a las zonas costeras por acción de las lluvias, la cual puede contener altas concentraciones de materia fecal y aún cuando las concentraciones detectadas en este periodo fueron menores, de acuerdo al modelo existe un riesgo del 50%, y el riesgo disminuye al aumentar la temperatura aún cuando la turbidez aumente, por lo que el efecto de la turbidez solo se verá reflejada cuando las condiciones de temperatura del medio no afecte la presencia de quistes.

### Confirmación de las Muestras por PCR

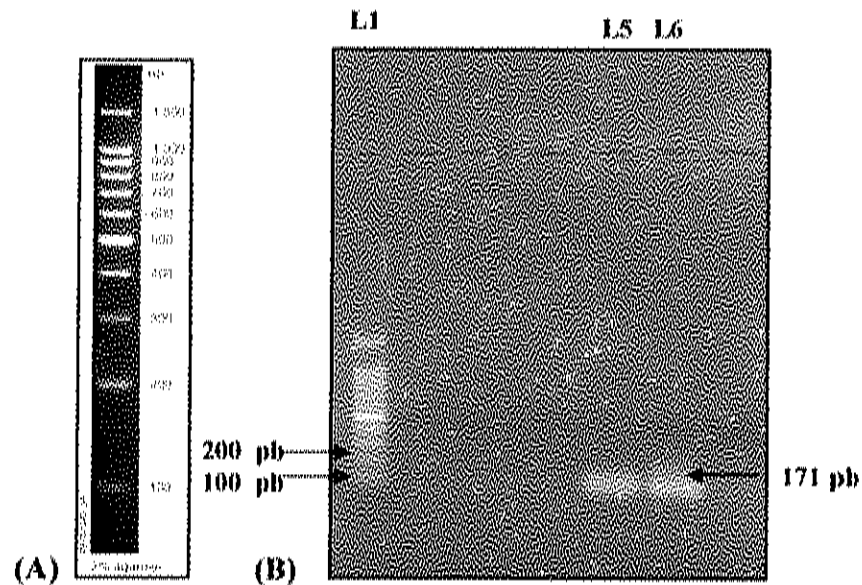
Los resultados obtenidos para la confirmación de las muestras para la presencia de *Cryptosporidium* spp., no se observó el fragmento de producto de PCR de 361pb correspondiente al gen *hsp70* en las muestras analizadas, el control positivo se observó claramente el fragmento del gen amplificado y el control negativo no mostró fragmento (Fig. 10). Los primers seleccionados para la detección de *Cryptosporidium* spp. detectan el gen que codifica para una proteína de choque térmico, las proteínas de choque térmico son las de mayor producción cuando un organismo esta sujeto a estrés (Rochelle y col., 1997). El gen *hsp70* ha sido utilizado como blanco confiable para el análisis de secuencias para determinar genotipos de *C. parvum*, y especies estrechamente relacionadas (Sulaiman y col., 2000).



**Figura 10. Gel de Electroforesis al 1% para *Cryptosporidium* spp.** (A) Patrón de bandas de marcador de peso molecular de 100pb (DNA, Ladder, Promega). (B) Gel de electroforesis donde se observan las posiciones de las muestras procesadas en la línea 1 (L1) se muestra el marcador de peso molecular de 100pb (DNA Ladder, Promega), en la línea 2 (L2), se observa el control negativo y en la línea 4 (L4) el control positivo. Comparando con el marcador el peso molecular del gen amplificado se encuentra entre 300-400pb.

Los resultados obtenidos de la confirmación de las muestras para la presencia de *Giardia* spp., en las muestras de agua de mar analizadas no fueron positivas, no se observó el fragmento de producto de PCR de 171pb del gen *giardina*, el control positivo se observó claramente el fragmento del gen amplificado (Fig. 11) y el control negativo no mostró fragmento. Los primers seleccionados para la detección de *Giardia* spp. detectan el gen que codifica para una proteína llamada *giardina* la cual forma parte estructural del disco succionador ventral y es una proteína producida únicamente por *Giardia*. Mahbubani y col. (1991), demostraron que la producción de bandas de 171pb identificaba solo especies de *Giardia* y no se presentaba en otros microorganismos probados y de esta manera concluyeron que el gen *giardina* puede ser usado como base para el diagnóstico por PCR para la presencia de *Giardia* spp. con gran especificidad y sensibilidad necesaria para muestras ambientales.





**Figura 11. Gel de Electroforesis al 1% para *Giardia* spp.** (A) Patrón de bandas de marcador de peso molecular de 100pb (DNA, Ladder, Promega). (B) Gel de electroforesis donde se observan las posiciones de las muestras procesadas, en la línea 1 (L1) se muestra el marcador de peso molecular de 100pb (DNA, Ladder, Promega), en la línea 5 (L5), se observa el control negativo y en la línea 6 (L6) el control positivo. Comparando con el marcador de peso molecular, el gen amplificado se encuentra entre 100-200pb.

*Giardia* y *Cryptosporidium* son zoonosis presentes en agua contaminada, y requieren del desarrollo de métodos de detección efectivos y sensibles que permitan no solo la confirmación de las muestras, si no también la tipificación de las especies que tienen importancia en la salud pública. La separación inmunomagnética, seguida por la

detección de anticuerpos o la PCR (para quistes y ooquistes intactos) parecen ser las formas más efectivas (Slifko y col., 2000).

La confirmación de las muestras positivas para *Cryptosporidium* y *Giardia* no fue posible por PCR, esto puede ser debido a que el paso de disociación ácida en la IMS afectó a los quistes presentes en las muestras, desintegrando su material genético y el tiempo de procesamiento de las muestras desde su obtención y la extracción de ADN, fue muy prolongado o bien la concentración de los oo/quistes era muy baja. Sin embargo, diversos estudios demuestran que es posible acoplar el método 1623 a técnicas moleculares como la PCR, la cual puede ser una excelente herramienta para rastrear la fuente microbiana, para realizar la valoración de riesgo a la salud humana.

Xiao y col. (2001), analizaron 55 muestras de aguas superficiales y 49 muestras de aguas residuales, ellos utilizaron el concentrado de la IMS para la detección de *Cryptosporidium* por PCR, y observaron que 25 de las muestras de aguas superficiales y 12 muestras de aguas residuales fueron positivas para *Cryptosporidium*, posteriormente realizaron un análisis de restricción (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Technique) que mostró la presencia de varias especies. En las muestras de aguas residuales se observó *C. parvum*, *C. baileyi* y *C. andersoni*, mientras que en las muestras de aguas residuales se observaron genotipos de *C. parvum* anteriormente identificados en humanos, vacas y perros, *C. felis*, *C. ardesoni* y una especie desconocida de *Cryptosporidium*, este estudio concluye que la caracterización molecular de

*Cryptosporidium* hace posible la diferenciación de especies patógenas al humano de aquellas que no lo son y permiten realizar el rastreo de la fuente microbiana.

Jiang y col. (2005), analizaron 121 muestras provenientes de tres reservorios de agua, de las cuales 107 fueron positivas para *Cryptosporidium* por PCR, 101 (94.4%) de las muestras se asociaron como fuente de contaminación animales salvajes presentes en estas zonas cuando se realizó la técnica de PCR-RFLP y *Cryptosporidium hominis* fue detectado en seis de las muestras analizadas. En este mismo estudio, se procesaron 113 muestras por el método 1623, de las cuales 63 (55.7%) fueron positivas para *Cryptosporidium* y 39 (78%) de las muestras negativas por microscopia fueron positivas por PCR, cabe mencionar que en este estudio no realizaron la disociación ácida al final de la IMS y la extracción de ADN se realizó directamente de las perlas asociadas al los ooquistes de *Cryptosporidium* presentes en las muestras.

La detección de pequeños números de organismos en una muestra de agua, limitan el rango de los métodos que pueden ser empleados sobre un número definido de organismos, principalmente cuando se pretende la extracción de ADN de una muestra para pruebas moleculares (Cotruvo y col., 2004). En base a los controles positivos que se manejaron en este estudio, los procesos de extracción y PCR, fueron resultados favorables que permiten establecer dentro del laboratorio de investigación nuevas rutas y herramientas de detección de protozoarios en el agua.

*Cryptosporidium* hace posible la diferenciación de especies patógenas al humano de aquellas que no lo son y permiten realizar el rastreo de la fuente microbiana.

Jiang y col. (2005), analizaron 121 muestras provenientes de tres reservorios de agua, de las cuales 107 fueron positivas para *Cryptosporidium* por PCR, 101 (94.4%) de las muestras se asociaron como fuente de contaminación animales salvajes presentes en estas zonas cuando se realizó la técnica de PCR-RFLP y *Cryptosporidium hominis* fue detectado en seis de las muestras analizadas. En este mismo estudio, se procesaron 113 muestras por el método 1623, de las cuales 63 (55.7%) fueron positivas para *Cryptosporidium* y 39 (78%) de las muestras negativas por microscopía fueron positivas por PCR, cabe mencionar que en este estudio no realizaron la disociación ácida al final de la IMS y la extracción de ADN se realizó directamente de las perlas asociadas al los ooquistes de *Cryptosporidium* presentes en las muestras.

La detección de pequeños números de organismos en una muestra de agua, limitan el rango de los métodos que pueden ser empleados sobre un número definido de organismos, principalmente cuando se pretende la extracción de ADN de una muestra para pruebas moleculares (Cotruvo y col., 2004). En base a los controles positivos que se manejaron en este estudio, los procesos de extracción y PCR, fueron resultados favorables que permiten establecer dentro del laboratorio de investigación nuevas rutas y herramientas de detección de protozoarios en el agua.

## CONCLUSIONES

- De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos concluir que existe la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en un 78.57% (11/14) en las muestras analizadas en la bahía de Altata y en 54.14% la presencia de quistes de *Giardia*, así como, en las muestras analizadas en Mazatlán existe la presencia de ooquistes en un 83.33% (15/18) y en un 72.22%(13/18) la presencia de quistes de *Giardia*.
- La concentración media de ooquistes de *Cryptosporidium* detectada en la bahía de Altata fue de 560.71 ooquistes/10 L, en un rango de 150-2050 ooquistes/10L y la concentración media de *Giardia* fue de 60.71 quistes/10L, en un rango de 50-150 quistes/10L. En Mazatlán, la concentración media de ooquistes detectada fue de 619 ooquistes/10L, en un rango de 150-2000 ooquistes y la concentración media de quistes de *Giardia* detectada fue de 84 quistes/10L en un rango de 10-300 quistes/10 L.
- Los resultados obtenidos en el modelo de regresión logística demuestra que la temperatura es un factor que influye en el riesgo de presencia/ausencia de ooquistes de *Cryptosporidium*, a bajas temperaturas (19°C) mayor riesgo de presencia/ausencia de ooquistes.

- Los resultados obtenidos en el modelo de regresión logística demuestra que la temperatura y la turbidez son factores que influyen en el riesgo de presencia/ausencia de quistes de *Giardia*, a bajas temperaturas (19°C) mayor riesgo de presencia/ausencia de quistes y a mayores niveles de turbidez (5 NTU), mayor riesgo de presencia/ausencia de quistes.

## SUGERENCIAS

La contaminación microbiológica del agua de mar en sitios donde se realizan actividades recreativas debe ser monitoreada periódicamente, no sólo la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal, si no también microorganismos patógenos como *Cryptosporidium* y *Giardia*, que aún en bajas concentraciones pueden representar un riesgo a la salud. Es necesario, la realización de estudios epidemiológicos locales que demuestren la relación directa con la presencia de ambos protozoarios, que permitan el establecimiento de guías o lineamientos para asegurar la calidad del agua de las playas, libres de contaminación microbiológica.

Es importante que organismos gubernamentales involucrados sumen esfuerzos por mejorar el programa establecido de Playas Limpias y se den a conocer los resultados de manera oportuna a la población que visita los principales destinos turísticos en las zonas costeras del estado, fomentando en la población las actividades turísticas y la corresponsabilidad, para mantener las playas libres de cualquier contaminación.

El método utilizado en la detección de protozoarios en el agua de mar, puede ser utilizado acoplando técnicas de biología molecular, como la RT-PCR, para evaluar la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*, y con ello establecer riesgos a la salud, no solo de estar presentes, si no de que sean capaces de iniciar una infección. De igual forma, se puede realizar rastreos de la fuente microbiana,

por medio de PCR, que permitan la confirmación de las muestras positivas obtenidas por el método de inmunofluorescencia y la identificación de las especies presentes en las muestras ambientales.

El modelo de Regresión Logística permite hacer predicciones sobre la presencia de microorganismos, con base a factores que influyen en su presencia, pero es necesario, que el tamaño de muestras sea adecuado para que el modelo tenga mayor confiabilidad y así como establecer previamente el conjunto de factores a analizar que permitan una predicción de riesgos más acertado.

Los resultados obtenidos, pueden servir como base para futuros estudios relacionados con establecer el riesgo de las concentraciones detectadas en el agua de mar y establecer estándares que sean incluidos en las guías o normas en aguas de uso recreativo.



## LITERATURA CITADA

Abbaszadegan, M., Huber, M. S., Gerba, C. P., Pepper, I. L. 1997. Detection of Viable *Giardia* Cysts by Amplification of Heat Shock-Induced mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*.63 (1), 324-328.

Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Applied and Environmental Microbiology*. 14 (3), 447-475.

American Public Health Association (APHA). 1999. Standar Methods for Examination of Water and Wastewater 20th. 9213. Recreational Water. *American Water Association. Water Environment Federation. USA.*

Atlas, R. M., Bartha, R. 1993. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. USA. pp. 214-228, 263-265.

Bartram, J., Rees, G. 2000. Monitoring Bathing Waters. E& FN SPON. New York. pp. Chapter 1,8.1-12,113-214.

Bingham, A. K., Jarroll, E. L., Meyer, E. A., Radulescu, M., Radulescu, S. 1979. *Giardia* sp.: Physical Factors of Excystation *in vitro*, and Excystation vs Eosin Exclusion as Determinants of Viability. Abstract. *Experimental Parasitology*. 47 (2), 284-291.

Bitton, G. 1994. Wastewater Microbiology. John Wiley and Sons, Inc. New York.21; 77-81; 92-100;153-154.

Buckhari, Z., McCuin, R. M., Fricker, C. R., Clancy, J. L. 1998. Immunomagnetic Separation of *Cryptosporidium parvum* from Source Water Samples of Various Turbidities. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (11), 4495-4499.

Caccio, S. M., De Giacomo, M., Aulicino, F. A., Pozio, E. 2003. *Giardia* Cysts in Wastewater Treatment Plants in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (6), 3393-3398.

Carpenter, C., Fayer, R., Trout, J., Beach, M. J. 1999. Chlorine Disinfection of Recreational Water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerging Infectious Diseases*. 5 (4), 579-584.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2000. Barwick R S, Levy D A, Craun G F, Beach M J, Calderon R L. Surveillance for Waterborne-Disease Outbreaks Associated with Recreational Water- United States, 1997-1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 49, 1-21.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2004. Yoder J S, Blackburn B G, Craun G F, Hill V, Levy D A. Surveillance for Waterborne-Disease Outbreaks Associated with Recreational Water- United States, 2001-2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report*.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2005a. Parasites and Health. Cryptosporidiosis. <http://www.dpd.cdc.gov> 10/04/06.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2005b. Parasites and Health. Giardiasis. <http://www.dpd.cdc.gov> 10/04/06

Chaidez, C., Soto, M., Gortares, P., Mena, K. 2005. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Irrigation Water and its Impact on Fresh Produce Industry. *International Journal of Environmental Health Research*. 15 (5), 339-345.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). 2006. Calidad del Agua en las Playas. <http://www.cofepris.gob.mx/by/comunicados/b56.pdf> 26/11/06.

Coordinación General de Turismo (CGT). 2003. Turismo 2003. Sinaloa. <http://www.sinaloa.gob.mx/LAIP/Coordinaciones/CGT/progserv/infact/Actividades+del+Sector+Turistico+2003.htm> 26/11/06

Cordero del Campillo, M., Rojo, V. F., Martínez, F. A., Sánchez, A. M., Hernández, R. S., Navarrete, L. L., Díez, B. P., Quiroz, R. H., Carvalno, V. M. 1999. Parasitología Veterinaria. Edit. McGraw-Hill Interamericana. España. 213-217; 221-222.

Cotruvo, J. A., Dufour, A., Rees, G., Bartram, J., Carr, R., Cliver, D. O., Craun, G. F., Fayer, R., Gannon, V. P. J. 2004. Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control. World Health Organization (WHO). IWA Publishing, London, UK. Section II, 17-86; III, 91-133.

deRegnier, D. P., Cole, L., Schupp, D. G., Erlandsen, S. L. 1989. Viability of *Giardia* Cysts Suspended in Lake, River, and Tap Water. *Applied and Environmental Microbiology*. 55 (5), 1223-1229.

DiGiorgio, C. L., Gonzalez, D., Huitt, C. C. 200). *Cryptosporidium* and *Giardia* Recoveries in Natural Waters by Using Environmental Protection Agency Method 1623. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (12), 5952-5955.

Dufour, A. P., Evans, O., Behymer, T. D., Cantu, R. 200). Water Ingestion During Swimming Activities in a Pool: a Pilot Study. *Journal of Water and Health*. 04.4, 425-430.

Environmental Protection Agency (EPA). 1995. Information Collection Rule (ICR) Protozoan Methods for Detecting *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Water by a Fluorescent Antibody Procedure. EPA/814-B95/003. USEPA, Ofce. of Ground Water and Drinking Water, Washington, DC.

Environmental Protection Agency (EPA). 1999. Guidance Manual for Compliance with the Interim Enhanced Surface Water Treatment Rule: Turbidity Provisions. EPA-815-R-99-010. USA. [http://www.epa.gov/safewater/mdbp/pdf/turbidity/chap\\_07.pdf](http://www.epa.gov/safewater/mdbp/pdf/turbidity/chap_07.pdf) 26/11/06.

Environmental Protection Agency (EPA). 2001. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. USA.

Environmental Protection Agency (EPA). 2004. *Giardia*: Drinking Water Sheet. Office of Water. USA. pp 1-5.

Fayer, R., Nerad, T. 1996. Effects of Low Temperatures on Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (4), 1431-1433.

Fayer, R., Farley, C. A., Lewis, E. J., Trout, J. M., Graczyk, T. K. 1997. Potential Role of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, in the Epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (5), 2086-2088.

Fayer, R., Graczyk, T. K., Lewis, E. J., Trout, J. M., Farley, C. A. 1998a. Survival of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Seawater and Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (3), 2610-2616.

Fayer, R., Trout, J. M., Jenkins, M. C. 1998b. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Stored in Water at Environmental Temperatures. *The Journal of Parasitology*. 84 (6), 1165-1169.

Fayer, R., Morgan, U., Upton, S. J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmisión, Detection and Identification. *International Journal for Parasitology*. 30, 1305-1322.

Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: Water-borne Zoonotic Parasite. *Veterinary Parasitology*. 126, 37-56.

Fayer, R., Dubey, J. P., Lindsay, D. S. 2004. Zoonotic Protozoa: from Land to Sea. *TRENDS in Parasitology*. 20 (11), 531-536.

Fleisher, J. M., Kay, D., Wyer, M. D., Godfree, A. F. 1998. Estimates of the Severity of Illnesses Associated with Bathing in Marine Recreational Waters Contaminated with Domestic Sewage. *International Epidemiological Association*. 27: 722-726.

Freire-Santos, F., Oteiza-López, A. M., Vergara-Castiblanco, C. A., Ares-Mazás, M. E. 1999. Effect of Salinity, Temperature and Storage Time on Mouse Experimental Infection by *Cryptosporidium parvum*. *Veterinary Parasitology*. 87, 1-7.

Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L., Tabares, E., Lopez-Rodas, V., Costas, E. 2000. Detection of Infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and Cockles (*Cerastoderma edule*). *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (5), 1866-1870.

Gómez-Couso, H., Méndez-Herminda, F., Castro-Herminda, J. A., Ares-Mazás, E. 2005. *Giardia* in Shellfish-Farming Areas: Detection in Mussels, River Water and Waste Waters. *Veterinary Parasitology*. 3, 1-5.

Griffin, D. W., Lipp, E. K., McLaughlin, R. M., Rose, J. B. 2001. Marine Recreation and Public Health Microbiology: Quest for the Ideal Indicator. *BioScience*. 51 (10), 817-825.

Hallier-Soulier, S., Guillot, E. 2000. Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Environmental Water Samples by Immunomagnetic Separation-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Applied Microbiology*. 89, 5-10

Harwood, V. J., Levine, A. D., Scott, T. M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S. R., Rose, J. B. 2005. Validity of the Indicator Organism Paradigm for Pathogen Reduction in Reclaimed Water and Public Health Protection. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (6), 3163-3170.

Ho, B. S. W., Tam, T. Y. 1998. Occurrences of *Giardia* Cysts in Beach Water. *Water Science and Technology*. 38 (12 ), 73–76.

Hsu, B., Huang, C., Hsu, Y., Jiang, G., Hsu, C. L. 2000. Evaluation of Two Concentration Methods for Detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in Water. *Water Research*. 35 (2), 419-424.

Isaac-Renton, J., Moorehead, W., Ross, A. 1996. Longitudinal Studies of *Giardia* Contamination in Two Community Drinking Water Supplies: Cysts Levels, parasite Viability, and Health Impact. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (1), 47-54.

Jarroll, E. D., Bingham, A. K., Meyer, E. A. 1981. Effect of Chlorine on *Giardia lamblia* Cysts Viability. *Applied and Environmental Microbiology*. 41 (2), 483-487.

Jiang, J., Alderisio, K. A., Xiao, L. 2005. Distribution of *Cryptosporidium* Genotypes in Storm Event Water Samples from Three Watersheds in New York. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (8), 4446-4454.

Johnson, D. C., Reynolds, K. A., Pepper, I. L., Gerba, C. P., Rose, J. B. 1995a. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Marine Waters. *Water Science Technology*. 31 (5), 439-442.

Johnson, D. C., Pieniasek, N. J., Griffin, D. W., Misener, L., Rose, J. B. 1995b. Development of PCR Protocol for Sensitive Detection *Cryptosporidium* Oocysts in Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (11), 3849-3855.

Johnson, D. C., Enriquez, C. E., Pepper, I. L., Davis, T. L., Gerba, C. P., Rose, J. B. 1997. Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, Poliovirus and *Salmonella* in Marine Waters. *Water ScienceTechnology*. 35 (11-12), 261-268.

King, B. J., Keegan, A. R., Monis, P. T., Saint, C. P. 2005. Environmental Temperature Controls *Cryptosporidium* Oocysts Metabolic Rate and Associated Retention of Infectivity. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (7), 3848-3857.

Kleinbaum, D. G., Kupper, L. L., Muller, K. E., Nizam, A. 1998. Applied Regression Analysis and Other Multivariate Methods. 3<sup>rd</sup> ed. Duxbury Press. An International Thompson Publishing Company. USA. pp 656-663.

Kleinbaum, D. G., Klein, M. 2002. Logistic Regression: a self-learning text. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlang New York. USA. pp. 4-21.

LeChevallier, M. W., Norton, W. D., Lee, R. G. 1991a. *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Filtered Drinking Water Supplies. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (9), 2617-2621.

LeChevallier, M. W., Norton, W. D., Lee, R. G. 1991b. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Surface Water Supplies. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (9), 2610-2616.

LeChevallier, M. W., Norton, W. D., Siegel, J. E., Abbaszadegan, M. 1995. Evaluation of the Immunofluorescence Procedure for Detection of *Giardia* Cyst and *Cryptosporidium* Oocysts in Water. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (2), 690-697.



LeChevallier, M. W., Di Giovanni, G. D., Clancy, J. L., Bukhari, Z., Bukhari, S., Rosen, J. S., Sobrinho, J., Frey, M. M. 2003. Comparison of Method 1623 and Cell Culture-PCR for Detection of *Cryptosporidium* spp. in Source Waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (2), 971-979.

Lederberg, J. 2000. Encyclopedia of Microbiology. Academic Press, 2<sup>nd</sup> edition. Vol. 3. United States of America. pp. 787-790.

Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Perlin, M., Schaefer, F. W., Jacobowski, W., Atlas, R. M. 1991. Detection of *Giardia* Cysts by Using the Polymerase Chain Reaction and Distinguishing Live from Dead Cysts. *Applied and Environmental Microbiology*. 54 (12), 3456-3461.

Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Perlin, M., Schaefer, F. W., Jacobowski, W., Atlas, R. M. 1992. Differentiation of *Giardia duodenalis* from Other *Giardia* spp. by Using Polymerase Chain Reaction and Gene Probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 30 (1), 74-78.

Maier, R. M., Pepper, I. L., Gerba, C. P. 2000. Environmental Microbiology. Academic Press. USA. pp.: 2; 186-190; 221.

Marshall, M. M., Naumovitz, D., Ortega, Y., Sterling, C. 1997. Waterborne Protozoan Pathogens. *Clinical Microbiology Review*. 10 (1), 67-85.

Marquardt, W. C., Demaree, R. S., Grieve, R. B. 2000. Parasitology and Vector Biology. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press. USA. pp.:157-164.

Mathieu, E., Levy, D., Veverka, F., Parrish, M. K., Sariski, J., Shapiro, N., Johnston, S., Handzel, T., Hightower, A., Xiao, L., Lee, Y. M., York, S., Arrowood, M., Lee, R., Jones, J. L. 2004. Epidemiologic and Environmental Investigation of a Recreational Water Outbreak caused by two Genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*. 71 (5), 582-589.

Medema, G. J., Schets, F. M., Teunis, P. F. M., Havelaar, A. H. 1998. Sedimentation of Free and Attached *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts in Water. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (11), 4460-4466.

McCuin, R. M., Buckhari, Z., Sobrinho, J., Clancy, J. L. 2001. Recovery of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts from Source Water concentrates using Immunomagnetic Separation. *Journal of Microbiological Methods*. 45, 69-76.

Molinero, L. M. 2001 La Regresión Logística (I). Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión. España. <http://www.seh-ielha.org/rlogis1.htm> 15/11/06.

Natural Resources Defense Council (NRDC). 2004. Testing the Waters 2004. A Guide to Water Quality at Vacation Beaches. USA. [www.nrdc.org](http://www.nrdc.org) 26/11/06.

Ong, C., Moorehead, W., Ross, A., Isaac-Renton, J. 1996. Studies of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in Two Adjacent Watersheds. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (8), 2798-2805.

Ono, K., Tsuji, H., Kumar, R. S., Yamamoto, A., Masuda, K., Endo, T., Kawamura, T., Uga, S. 2001. Contamination of River Water by *Cryptosporidium* Oocyst in Western Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (9), 3832-3836.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2003. Guidelines for Safe Recreational Water Environments. World Health Organization Vol. 1, Chapter 1; 1-18; Chapter 4; 51-95.

Pepper, I. L., Gerba, C. P., Brusseau, M. L. 2006. Environmental and Pollution Science. 2<sup>nd</sup> Edition. Academic Press. USA. Chapter 3,5; 34-35; 59.

Prieto, M. D., López, B., Juanes, J. A., Revilla, J. A., Llorca, J., Delgado-Rodríguez, M. 2001. Recreation in Coastal Waters: Health Risks Associated with Bathing in Sea Water. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 55, 442-447.

Quintero-Betancourt, W., Gennaccaro, A. L., Scout, T. M., Rose, J. B. 2003. Assessment of Methods for Detection on Infectious *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts in Reclaimed Effluents. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (9), 5380-5388.

Quiroz, R. H. 2005. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. Edit. LIMUSA, México. pp. 19.

Robertson, L. J., Campell, A. T., Smith, H. V. 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* Oocysts under Environmental Pressures. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (11), 3494-3500.

Rochelle, P. A., Ferguson, D. M., Handojo, T. J., De Leon, R., Stewart, M. H., Wolfe, R. L. 1997a. An Assay Combining Cell Culture with Reverse Transcriptase PCR to Detect and Determine the Infectivity of Waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (5), 2029-2037.

Rochelle, P. A., De Leon, R., Stewart, M. H., Wolfe, R. L. 1997b. Comparison of Primers and Optimization of PCR Conditions for Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (1), 106-114.

Rochelle, P. A, De Leon, R., Johnson, A., Stewart, M. H., Wolfe, R. L. 1999. Evaluation of Immunomagnetic Separation for Recovery of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts from Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (2), 841-845.

Rose, J. B., Landeen, L. K., Riley, K. R., Gerba, C. P. 1989. Evaluation of Immunofluorescent Techniques for Detection of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts from Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (12), 3189-3196.

Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., Lukasik, J. 2002. Microbial Source Traking: Current Methodology and Future Directions. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (12), 5796-5803.

Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA). 2004. Lineamientos para Determinar la Calidad de Agua de Mar para Uso Recreativo con Contacto Primario. pp. 3-15.

Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA). 2005. Estadísticas de Mortalidad y Morbilidad en México. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx) 20/08/06.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2004. Programa Integral de Playas Limpias.

<http://www.semarnat.gob.mx/informacionambiental/Pages/playas.aspx> 05/12/06

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2006. Destinos Turísticos: Mazatlán y Bahía de Altata. Calidad Bacteriológica del Agua de Mar.

<http://www.semarnat.gob.mx/informacionambiental/Pages/playas.aspx> 07/12/06

Slifko, T. R., Smith, H. V., Rose, J. B. 2000. Emerging Parasite Zoonoses Associated with Water and Food. *International Journal for Parasitology*. 30, 1379-1393.

Stinear, T., Matusan, A., Hines, K., Sandery, M. (1996). Detection of a Single Viable *Cryptosporidium parvum* Oocyst in Environmental Water Concentrates by Reverse Transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (9), 3385-3390.

Sulaiman, I. M., Morgan, U. M., Thompson, R. C. A., Lal, A. A., Xiao, L. 2000. Phylogenetic Relationship of *Cryptosporidium* Parasites Based on the 70-Kilodalton Shock Protein (HSP70) Gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (6), 2385-2391.

Sulaiman, I. M., Jiang, J., Singh, A., Xiao, L. 2004. Distribution of *Giardia duodenalis* Genotypes and Subgenotypes in Raw Urban Wastewater in Milwaukee, Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (6), 3776-3780.

Tay, J. 1995. Microbiología y Parasitología Médicas. Méndez Editores. 2da. edición México, D. F. pp. 3.40-3.45, 3.58-3.61

Thompson, R. C. A., Olson, M. E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M. S., Hijjawi, N. S. 2005. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*. 59, 77-158.

Vega, M. B, Martinez, C. I., Chaidez, C. 2006. Presencia de Enterococos en Agua de Mar de Playas de Sinaloa. Tesis de Licenciatura. CIAD, Unidad Culiacán.

Wallis, P. M., Erlandsen, S. L., Isaac-Renton, J. L., Olson, M. E., Robertson, W. J., Keulen, H. 1996. Prevalence of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts and Characterization of *Giardia* spp. Isolated from Drinking Water in Canada. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (8), 2789-2797.

Wolfe, M. S. 1992. Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 5 (1), 93-100.

Xiao, L., Singh, A., Limor, J., Graczyk, T. K., Gradus, S., Lal, A. 2001. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* Oocysts in Samples of Raw Surface Water and Wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (3), 1097-1101.

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.

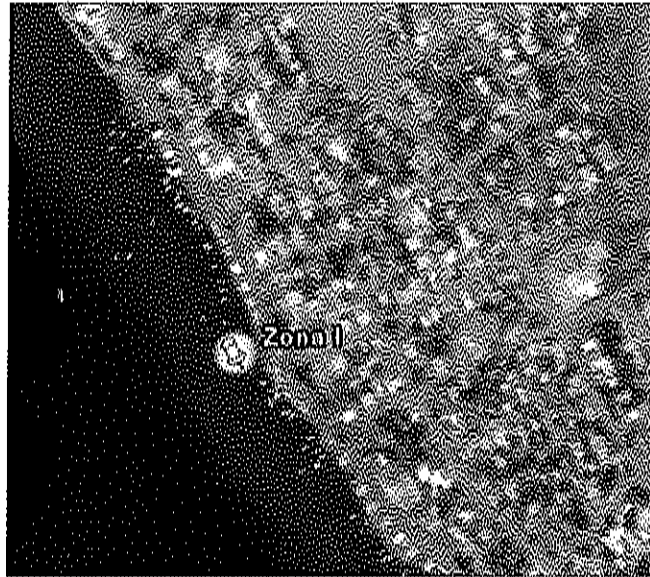
Yoder J S, Blackburn B G, Craun G F, Hill V, Levy D A. 2004. Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated with Recreational Water-United States, 2001-2002. CDC, MMWR Surveillance Sumaries. 53 pp. 1-22.

Zarlenga, D. S., Trout, J. M. 2004. Concentrating, Purifying and Detecting Waterborne Parasites. *Veterinary Parasitology*. 126, 195-217.

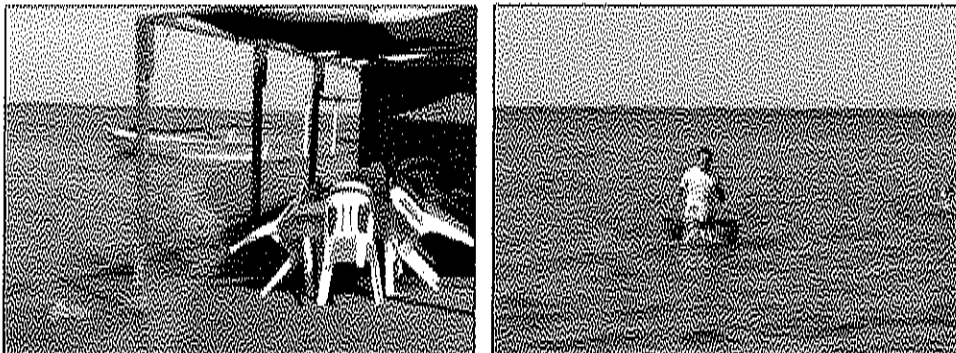
## ANEXOS

### 1. Puntos de muestreo

#### Zona I Altata



Ubicación geográfica  $24^{\circ}37'53.55''$  Latitud Norte y  $107^{\circ}55'50.92''$  Longitud Oeste  
(Google 2006)





**Zona II Altata**

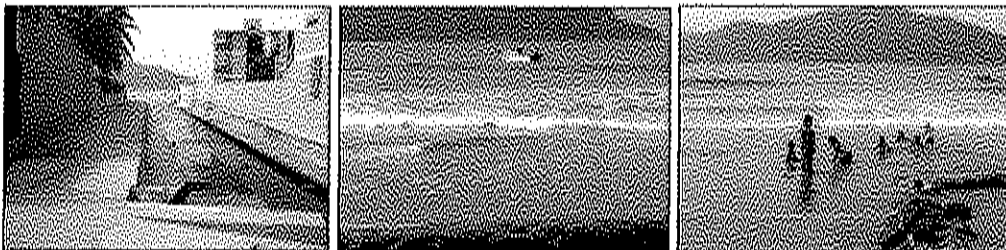


**Ubicación geográfica 24° 38'12.57" Latitud Norte y 107° 56'5.66" Longitud Oeste  
(Google 2006)**



**Zona I Mazatlán**

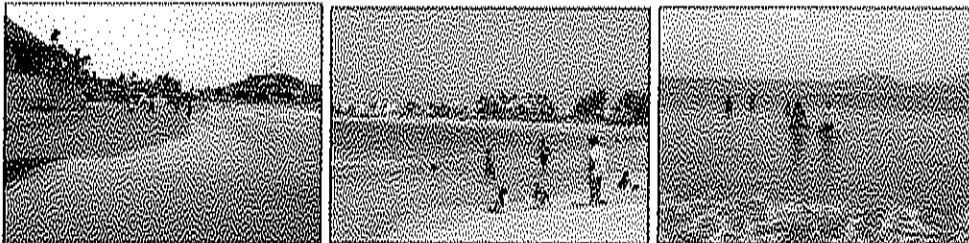
**Ubicación geográfica 23° 14'35.42" Latitud Norte y 106° 27'15.68" Longitud Oeste  
(Google 2006)**



## Zona II Mazatlán



Ubicación Geográfica  $23^{\circ} 12' 56''$  Latitud Norte y  $106^{\circ} 25' 18.67''$  Longitud Oeste  
(Google 2006)



### Zona III Mazatlán



Ubicación Geográfica 23° 11'4.33" Latitud Norte y 106° 25'30.33" Longitud Oeste  
(Google 2006)



### 2. Procedimiento de toma de muestra de agua de mar



**3. Concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*/10L de muestras en la Bahía de Altata**

No. Muestra	Zona	Fecha	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	T (°C)	pH	S (‰)	Tu (NTU)
1	I	15/11/05	950	50	24	7.98	27	2
2	II	15/11/05	350	0	24	8.6	27	3
3	I	25/01/06	2050	0	24	8.1	27	3
4	II	25/01/06	1850	100	20	8.13	27	3
5	I	02/02/06	0	0	20	8.09	22.5	2
6	II	02/02/06	0	100	19	8.08	27.5	3
7	I	08/03/06	150	100	24	7.95	27	3.3
8	II	08/03/06	250	100	22	8.08	32	2.8
9	I	05/04/06	600	150	24	7.95	32	4.4
10	II	05/04/06	700	150	23	8.08	31	2.3
11	I	03/05/06	150	0	26	8.01	31	3.36
12	II	03/05/06	400	100	26	8.07	35	2.8
13	I	12/07/06	0	0	32	8.11	32.5	3.5
14	II	12/07/06	0	0	33	8.11	33.5	3

**4. Concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*/10L de muestras en Mazatlán**

<b>No. Muestra</b>	<b>Zona</b>	<b>Fecha</b>	<b><i>Cryptosporidium</i></b>	<b><i>Giardia</i></b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>S (‰)</b>	<b>Tu (NTU)</b>
1	I	03/11/05	1600	200	25	8.18	25	3
2	II	03/11/05	2000	100	26.5	8.04	25	5
3	III	03/11/05	700	50	25	7.42	26	5
4	I	31/01/06	200	50	19	7.94	25.5	3
5	II	31/01/06	150	0	20	7.98	25	3
6	III	31/01/06	300	0	21	7.91	26.5	2
7	I	28/02/06	1700	300	22	7.9	31	2.4
8	II	28/02/06	1850	100	23	7.08	30	3.2
9	III	28/02/06	500	50	23	4.5	32	2.6
10	I	29/03/06	300	50	22	8.14	32	3.72
11	II	29/03/06	400	200	24	8.09	27	3.76
12	III	29/03/06	150	0	27	7.89	26.5	2
13	I	19/04/06	450	100	25	8.06	29	3.89
14	II	19/04/06	550	150	27	7.94	28.5	4.67
15	III	19/04/06	300	150	26	7.91	28	5.1
16	I	05/07/06	0	0	30	8.08	32.5	2.23
17	II	05/07/06	0	0	31	8.07	29.5	2.9

---

18	III	05/07/06	0	10	36	8.12	28	4.4
----	-----	----------	---	----	----	------	----	-----

---

**5. Concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*/10 L de Y  
niveles de Enterococos Altata**

---

No. de muestra	Zona	Fecha	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	Enterococos NMP/mL
1	I	15/11/05	950	50	106
2	II	15/11/05	350	0	75
3	I	25/01/06	2050	0	28
4	II	25/01/06	1850	100	15
5	I	02/02/06	0	0	42
6	II	02/02/06	0	100	52
7	I	08/03/06	150	100	27
8	II	08/03/06	250	100	60
9	I	05/04/06	600	150	45
10	II	05/04/06	700	150	54
11	I	03/05/06	150	0	55
12	II	03/05/06	400	100	89
13	I	12/07/06	0	0	829
14	II	12/07/06	0	0	960

---

---

18	III	05/07/06	0	10	36	8.12	28	4.4
----	-----	----------	---	----	----	------	----	-----

---

**5. Concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*/10 L de Y  
niveles de Enterococos Altata**

---

No. de muestra	Zona	Fecha	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	Enterococos NMP/mL
1	I	15/11/05	950	50	106
2	II	15/11/05	350	0	75
3	I	25/01/06	2050	0	28
4	II	25/01/06	1850	100	15
5	I	02/02/06	0	0	42
6	II	02/02/06	0	100	52
7	I	08/03/06	150	100	27
8	II	08/03/06	250	100	60
9	I	05/04/06	600	150	45
10	II	05/04/06	700	150	54
11	I	03/05/06	150	0	55
12	II	03/05/06	400	100	89
13	I	12/07/06	0	0	829
14	II	12/07/06	0	0	960

---



---

18	III	05/07/06	0	10	36	8.12	28	4,4
----	-----	----------	---	----	----	------	----	-----

---

**5. Concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*/10 L de Y  
niveles de Enterococos Altata**

---

No. de muestra	Zona	Fecha	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	Enterococos NMP/mL
1	I	15/11/05	950	50	106
2	II	15/11/05	350	0	75
3	I	25/01/06	2050	0	28
4	II	25/01/06	1850	100	15
5	I	02/02/06	0	0	42
6	II	02/02/06	0	100	52
7	I	08/03/06	150	100	27
8	II	08/03/06	250	100	60
9	I	05/04/06	600	150	45
10	II	05/04/06	700	150	54
11	I	03/05/06	150	0	55
12	II	03/05/06	400	100	89
13	I	12/07/06	0	0	829
14	II	12/07/06	0	0	960

---

**6. Concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*/10 L de Y  
niveles de Enterococos en Mazatlán**

No. de Muestra	Zona	Fecha	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	Enterococos NMP/mL
1	I	03/11/05	1600	200	12
2	II	03/11/05	2000	100	38
3	III	03/11/05	700	50	29
4	I	31/01/06	200	50	278
5	II	31/01/06	150	0	16
6	III	31/01/06	300	0	18
7	I	28/02/06	1700	300	29
8	II	28/02/06	1850	100	119
9	III	28/02/06	500	50	21
10	I	29/03/06	300	50	29
11	II	29/03/06	400	200	15
12	III	29/03/06	150	0	36
13	I	19/04/06	450	100	15
14	II	19/04/06	550	150	25
15	III	19/04/06	300	150	69
16	I	05/07/06	0	0	44
17	II	05/07/06	0	0	21
18	III	05/07/06	0	10	219