

Técnicas para la detección de *Cryptosporidium* sp. en Sistemas de Tratamiento de Agua Residual

Techniques for Cryptosporidium sp. detection in Wastewater Treatment Systems

**Arnedo, Ivonne¹; Bracho, Mariangela¹;
Díaz-Suárez, Odelis² y Botero, Ligia¹**

¹Centro de Investigaciones del Agua, Facultad de Ingeniería. Unidad de
Investigación en Microbiología Ambiental, Facultad de Ciencias,
Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

²Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette".
Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

E-mail: ligiabotero@cantv.net

Resumen

En este trabajo se evaluó la aplicabilidad de las técnicas de tinción de Kinyoun e Inmunofluorescencia, para el monitoreo periódico de la calidad parasitológica del agua residual del Sistema de Lagunas de Estabilización "Planta de Tratamiento de Aguas Servidas Sur" de la ciudad de Maracaibo. Se detectó *Cryptosporidium* sp. en el 100% de las muestras analizadas por las dos técnicas. Los promedios de *Cryptosporidium* sp. detectados por la técnica de Kinyoun fueron: en la entrada de la planta $4,9 \times 10^5$ ooquistes/100L, en los módulos primarios $1,2 \times 10^5$ ooquistes/100L, en la laguna facultativa $5,9 \times 10^4$ ooquistes/100L y en la salida $3,0 \times 10^4$ ooquistes/100L, mientras que para *C. parvum* por inmunofluorescencia fueron: $5,9 \times 10^4$ ooquistes/100L, $7,7 \times 10^4$ ooquistes/100L, $3,0 \times 10^5$ ooquistes/100L y $3,0 \times 10^4$ ooquistes/100L, respectivamente. Se observó una correspondencia del 100% de positividad en las muestras analizadas por ambas técnicas. Dada las ventajas en facilidad de aplicación, rapidez y costos que ofrece la técnica de Kinyoun, se sugiere su aplicación como técnica de rutina para la evaluación de *Cryptosporidium* sp. en muestras de agua residual. Se observó la presencia de parásitos en el efluente final, por lo tanto éste no es apto desde el punto de vista parasitológico, para ser empleado con fines de irrigación, sin representar un riesgo para la salud pública.

Palabras claves: *Cryptosporidium* sp, Kinyoun, Inmunofluorescencia, agua residual.

Abstract

This work evaluates the applicability of the Kinyoun and immunofluorescence techniques for periodic control of the parasitological quality of wastewater from the stabilization lagoon system "Wastewater Treatment Plant South" in the city of Maracaibo. *Cryptosporidium* sp. was detected in the 100% of the samples analyzed by both techniques. The concentration of *Cryptosporidium* sp. detected by the Kinyoun technique was: 4.9×10^5 oocysts/100L at the plant entrance, 1.2×10^5 oocysts/100L in the primary modules, 5.9×10^4 oocysts/100L in the facultative lagoon and 3.0×10^4 oocysts/100L in the final effluent, while those of *C. parvum* detected by immunofluorescence were: 5.9×10^4 oocysts/100L, 7.7×10^4 oocysts/100L, 3.0×10^5 oocysts/100L and 3.0×10^4 oocysts/100L, respectively. A 100% correspondence of the results from samples analyzed by both techniques was observed. Given the advantages in ease of application, rapidity and costs offered by the Kinyoun technique, its routine application for evaluating *Cryptosporidium* sp. in wastewater samples is suggested. The presence of parasites in the final effluent was observed; therefore, from the parasitological viewpoint, it is not apt for irrigation purposes, without representing a risk to human health.

Key words: *Cryptosporidium* sp., Kinyoun, immunofluorescence, wastewater.

Introducción

El agua residual contiene diversos tipos de nutrientes que pueden ser utilizados como fertilizantes capaces de promover el crecimiento de las plantas y animales; su reuso, permite obtener otros beneficios, como mayores oportunidades de trabajo en las zonas rurales, más y mejores cultivos y un uso menos frecuente de fertilizantes químicos (1, 2).

Los esquemas de reuso del agua residual, cuando son manejados segura y eficientemente, pueden permitir además, la rehabilitación de grandes extensiones de tierra para múltiples usos y simultáneamente, la preservación de fuentes de agua fresca para el consumo humano. Sin embargo, la irrigación de cosechas con agua residual que no ha recibido un tratamiento adecuado, puede generar problemas de salud pública, debido a las altas concentraciones de bacterias, virus y parásitos causantes de enfermedades que éstas aguas portan (2, 3).

La presencia de parásitos patógenos es uno de los principales problemas de salud pública al reutilizar el agua residual (4), sien-

do *Cryptosporidium* sp. uno de los protozoarios que se presenta principalmente en este tipo de sistema (5).

Cryptosporidium sp. es un parásito intracelular obligado que infecta las células epiteliales de los vertebrados, pudiendo causar una diarrea acuosa de corta duración que desaparece espontáneamente en seres inmunocompetentes y una diarrea severa persistente y prolongada, parecida al cólera, en inmunosuprimidos, es por ello que este parásito puede ser fatal en personas con SIDA/HIV+ o que están bajo tratamiento de quimioterapia (6, 7). La prevalencia es mayor en niños que en adultos y entre los primeros es más frecuente en menores de 5 años (8). La infección por este parásito puede dar lugar a un gran deterioro físico, desnutrición y consecuencias negativas en el crecimiento y desarrollo intelectual de los niños (9).

En Venezuela, *Cryptosporidium* sp. es endémico y ha sido reportado en las heces de individuos que padecen de infecciones gastrointestinales, con prevalencia que oscilan entre 5,35% y 7,4% (10). Pocos estudios se han realizado en el país sobre la presencia de

este protozooario en agua residual y en los efluentes tratados.

Una de las limitaciones que existen para el monitoreo de este parásito es que los métodos comúnmente usados para su detección resultan muy complejos y costosos para su aplicación en análisis de rutina (7), lo que plantea la necesidad de la búsqueda de métodos más económicos y prácticos que permitan llevar a cabo el control y monitoreo de la contaminación parasitaria del agua (11).

El ensayo de Inmunofluorescencia (IF) para detectar ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en muestras de agua, ha sido uno de los métodos recomendados por la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (12), debido a su alta sensibilidad. Otras de las técnicas para su detección, es la coloración permanente de Kinyoun, comúnmente empleada para el estudio de este protozooario en heces. Esta es una técnica que se fundamenta en la capacidad que tiene este colorante de teñir los ooquistes de los coccidios intestinales, ya que estos por la gruesa pared quística que presentan constituida por ácidos grasos, tiene la propiedad de retener colorantes a pesar de ser tratados con ácidos y alcoholes. En ésta se utiliza como colorante la fucsina básica fenolada, decolorando luego con ácido y contratiñendo con azul de metileno. Por ser un colorante específico para este tipo de parásito los ooquistes de *Cryptosporidium* sp. se tiñen de color rojo púrpura sobre el fondo de color azul (13).

En este trabajo se evalúa la aplicabilidad de las técnicas de IF y de tinción permanente de Kinyoun, para la detección de *Cryptosporidium* sp. en muestras de agua residual, con la finalidad de demostrar las ventajas de su uso en el monitoreo periódico de la calidad parasitológica de los sistemas de tratamiento de aguas servidas.

Materiales y Metodos

Sitio de muestreo

Se analizaron 10 muestras de agua tomadas al azar en el canal de entrada, módulos primarios, laguna facultativa y efluente final (para un total de 40 muestras) del Sistema de Lagunas de Estabilización "Planta de Tratamiento de Aguas Servidas Sur" de la ciudad de Maracaibo, durante los meses de Junio y Julio de 2004. Este sistema de tratamiento fue diseñado para tratar un caudal de 3.400 L/s de agua y cubre una población de más de 1 millón de personas que residen en la zona sur de la ciudad de Maracaibo (14).

Este sistema de tratamiento funciona en tres etapas consecutivas: laguna primaria (anaerobia), facultativa y maduración. En los módulos primarios, es degradada la materia orgánica presente en el agua residual al entrar en contacto con población microbiana anaeróbica y ocurre una sedimentación de sólidos suspendidos. En las lagunas facultativas, los sólidos sedimentables que salen de los módulos primarios, se depositan en el fondo y reciben un biotratamiento anaeróbico, mientras que el material orgánico no sedimentable, se somete a un biotratamiento aeróbico en la zona superior. Finalmente en las lagunas de maduración, se mejora desde el punto de vista bacteriológico, la calidad del efluente, en estas ocurre la remoción de los microorganismos patógenos excretados con las heces humanas, tales como virus, bacterias y huevos de parásitos, mediante la sedimentación, la acción de otros microorganismos depredadores y la luz ultravioleta del sol. Parte de los efluentes de este sistema de tratamiento son utilizados para el riego y el resto es descargado a través del canal de drenaje sur, hacia la cañada El Bajo, afluente al Lago de Maracaibo (15).

Toma de Muestras

Se tomaron muestras de cuatro litros de agua residual en recipientes plásticos previamente desinfectados, y se trasladaron al laboratorio en una cava con hielo para su procesamiento inmediato.

Concentración de las muestras

Una vez en el laboratorio, el envase que contenía los cuatro litros de muestra, se dejó en sedimentación por 24 horas, se descartó el sobrenadante por succión, y se recuperó el sedimento más aproximadamente, 2 ml del sobrenadante. Este volumen se distribuyó en botellas de 200 ml de capacidad y se centrifugó a 2500 x g durante 11 min. Al terminar la centrifugación, se eliminó el sobrenadante mediante succión y los sedimentos de cada botella fueron transferidos a un único tubo de centrífuga de 50 ml siendo preservados en 10 ml de dicromato de potasio al 2,5% y almacenándose a 4°C hasta su visualización.

Visualización e Identificación de Parásitos

La visualización de *Cryptosporidium* sp. se realizó por las técnicas de coloración de Kinyoun (13) e Inmunofluorescencia directa (Waterborne, INC. New Orleans, USA).

Para la Técnica de Kinyoun se tomó 25 µL del concentrado y se realizó un frotis, sobre una lámina portaobjeto, deslizando la muestra sobre 2/3 parte en el centro del mismo. Se dejó secar completamente a temperatura ambiente, se fijó con metanol y se dejó secar. Luego se cubrió completamente con fucsina básica fenolada, y se colocó en la llama del mechero hasta observar el desprendimiento de vapores. Posteriormente, se colocó la lamina en una jarra de koplín, se lavó con agua de chorro, se decoloró mediante lavado sucesivo con una solución de ácido sulfúrico

al 5%, se enjuagó nuevamente con agua de chorro y se dejó secar. Por último, se cubrió con una solución de azul de metileno según Loeffler durante 1 minuto. Al finalizar este tiempo, se lavó con agua de chorro y se dejó secar. La muestra se observó con el objetivo de inmersión de 100 X, visualizándose los ooquistes de *Cryptosporidium* sp. como estructuras de forma redonda teñidos de color rojo púrpura en un fondo de color azul (13).

La técnica de Inmunofluorescencia directa se llevó a cabo empleando el anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína A400FL Crypto-a-Glo™ (Waterborne, INC. New Orleans, USA) específico para la detección de *C. parvum*. Para ello, se colocó 30 µL de del concentrado sobre un portaobjeto, y se preparó el extendido en el centro del mismo. Se dejó secar completamente a temperatura ambiente, se agregó metanol sobre el extendido y se dejó secar, luego se cubrió completamente con el anticuerpo monoclonal marcado e inmediatamente se incubó por 30 minutos en cámara húmeda. Al finalizar este tiempo, se lavó la lámina portaobjeto un minuto en PBS para remover el exceso de anticuerpo y por último se le agregó 1 gota de líquido de montaje (Waterborne, INC. New Orleans, USA). La muestra se observó utilizando un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, West Germany) a través de un filtro de luz azul de 480 nm, empleando una magnificación de 400 X. Los ooquistes de *C. parvum* se observaron como estructuras con fluorescencia verde manzana brillante de forma redondeadas de 4 a 6 µm de diámetro.

La concentración de ooquistes de *C. parvum* en las muestras de agua se reportó en número de ooquistes por 100 L de muestra colectada, tomando en cuenta la fórmula que se presenta a continuación:

$$N = n \times S \times D / P \times V$$

Donde:

N= Número de ooquistes en el volumen de muestra analizada.

N= Número promedio de ooquistes por campo luego de contar mas de 30 campos diferentes seleccionados al azar.

S= área de la superficie del filtro.

D= Factor de dilución.

P= Área del campo.

V= Volumen de muestra filtrada.

En ambas técnicas las muestras se procesaron junto con controles negativos de PBS 1X estéril y controles positivos correspondientes a muestras de heces humanas positivas para *C. parvum*, esto con el fin de comprobar en cada caso que no ocurrió contaminación durante el procesamiento, que las soluciones se encontraban libres de parásitos y que los anticuerpos estaban funcionando correctamente.

Resultados

Las concentraciones de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. y *C. parvum* detectadas por las técnicas de Kinyoun y microscopía de Inmunofluorescencia, en las diferentes etapas del sistema para el tratamiento de aguas residuales por lagunas de estabilización analizado en este estudio se presentan en la Tabla I.

Los resultados obtenidos en este investigación muestran la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en el 100% de las muestras de agua residual analizadas por ambas técnicas. El promedio de ooquistes de *Cryptosporidium* sp detectados por la técnica de Kinyoun fue de $4,9 \times 10^5$ ooquistes/100L en la entrada, $1,2 \times 10^5$ ooquistes/100L en los módulos primarios, $5,9 \times 10^4$ ooquistes/100L en las lagunas facultativas y $3,0 \times 10^4$ ooquistes/100L en la salida del sistema de lagunas, mientras que por la técnica de microscopía de inmunofluorescencia directa el promedio de ooquistes de *C. parvum*

detectados fue de $8,1 \times 10^5$ ooquistes/100L en la entrada, $3,0 \times 10^5$ ooquistes/100L en los módulos primarios, $1,4 \times 10^5$ ooquistes/100L en la laguna facultativa y $7,7 \times 10^4$ ooquistes/100L en la salida.

Discusión

Las concentraciones de ooquistes de *C. parvum* detectadas en todas las muestras del efluente final del sistema de tratamiento de agua residual analizadas, fue superior al rango de 10 - 30 ooquistes/100 L conocido como nivel de acción o nivel de riesgo (16) el cual fue propuesto por Rose y Hass basándose en niveles de concentraciones de ooquistes de *C. parvum* detectados durante brotes epidémicos ocasionados en Estados Unidos por este protozoario (12, 16).

Los resultados obtenidos en este estudio, en relación a la presencia de *C. parvum* en el efluente final del sistema de tratamiento de agua pueden suponer un problema de salud pública, tomado en consideración que en países en vías de desarrollo como Venezuela, las prácticas agrícolas incluyen el uso de este tipo de aguas con fines de irrigación de cultivos y para el lavado de frutas y hortalizas que son consumidas al fresco (zanahoria, rábano, lechuga, cilantro y tomate, entre otras), y que *C. parvum* es capaz de soportar los desinfectantes comúnmente empleados para la desinfección pudiendo quedar adherido a la superficie del fruto, todo lo cual trae como consecuencia, problemas de salud en la comunidad, con repercusiones que inciden en el ámbito económico, social y político (17)

La presencia de ooquistes de protozoarios en la entrada de la planta se explica, ya que, se ha demostrado que existe una prevalencia moderada de este parásito entérico en la población, el cual es considerado como endémico en el Municipio Maracaibo (18-21).

Tabla 1. Concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. y *C. parvum* y porcentajes de remoción en muestras de una laguna de estabilización.

		Técnicas	
		Kinyoun	Inmunofluorescencia
		<i>Cryptosporidium</i> sp. Ooquistes/100L	<i>Cryptosporidium parvum</i> Ooquistes/100L
E	Min.	2,5x10 ⁵	4,6x10 ⁵
	Máx.	6,8x10 ⁵	1,3x10 ⁶
	Prom.	4,9x10 ⁵	8,1x10 ⁵
Remoción E-MP		64,10%	57,23%
MP	Min.	8,0x10 ⁴	1,4x10 ⁵
	Máx.	2,6x10 ⁵	6,2x10 ⁵
	Prom.	1,2x10 ⁵	3,0x10 ⁵
Remoción MP-LF		55,64%	53,98%
LF	Min.	1,2x10 ⁴	7,5x10 ⁴
	Máx.	1,0x10 ⁵	2,6x10 ⁵
	Prom.	5,9x10 ⁴	1,4x10 ⁵
Remoción LF-S		57,55%	48,97%
S	Min.	1,2x10 ⁴	2,5x10 ⁴
	Máx.	8,3x10 ⁴	1,6x10 ⁵
	Prom.	3,0x10 ⁴	7,7x10 ⁴
Remoción E-S		93,77%	90,06%

E-Entrada. MP-Módulos primarios. LF-Laguna facultativa. S-Salida.

Las concentraciones de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. detectadas en las diferentes lagunas que conforman el sistema de tratamiento indican porcentajes de remoción entre la entrada y el efluente final del sistema de 93,77% para *Cryptosporidium* sp. y 90,06% para *C. parvum*. Aunque este por-

centaje de remoción pudiera parecer suficiente, en realidad no lo es, sobre todo tomando en consideración que el objetivo es proteger la salud pública, ya que se estima que aún una remoción del 99% representa un 1% de supervivencia de la población de patógenos presentes en el agua, que en este caso

representa concentraciones de ooquistes del parásito en el orden de $3,0 \times 10^4$ ooquistes/100L en el efluente final, lo que constituye un riesgo elevado de infección de la población, considerando que este parásito es capaz de causar enfermedades a muy baja dosis infecciosa (17).

Con relación a los resultados de visualización obtenidos por las dos técnicas empleadas, se observó una correspondencia del 100% de positividad. Aunque cabría esperar la obtención de un porcentaje significativamente mayor de muestras positivas por la técnica de inmunofluorescencia, dada su alta sensibilidad (El método de inmunofluorescencia puede detectar 0,25 ooquistes/ 100 litros) y mejor contraste (17), no se observaron diferencias importantes en las concentraciones de ooquistes detectados por ambas técnicas. Esto es posible, ya que al tratarse de agua residual y por ser *Cryptosporidium* sp. un protozooario considerado endémico en el Estado, éste se encuentra en elevadas concentraciones, por lo que no se requiere de técnicas de elevada sensibilidad como la inmunofluorescencia directa para poder realizar su detección en este tipo de muestras.

Es preciso destacar las diferencias en términos de inversión que se presentan al implementar ambas técnicas. Mientras el procesamiento de cien muestras por la técnica de inmunofluorescencia directa implica un costo de aproximadamente 3.708 Bs.F. solo en reactivos, más la necesidad de contar con un microscopio equipado con sistema de fluorescencia e incluso la implementación de unas medidas especiales en el sitio donde se llevarán a cabo los análisis; el procesamiento de las muestras por la técnica de Kinyoun implica una inversión aproximada de 171 Bs.F. y únicamente es necesario contar con un microscopio ordinario de luz blanca, los reactivos que se utilizan generalmente se encuen-

tran en cualquier laboratorio de Microbiología. Además, con respecto a otras coloraciones permanentes es menos compleja, los tiempos de coloración son mas cortos y los reactivos que requiere son menores, por lo tanto su aplicación permite llegar a un diagnóstico rápido a menores costos.

En Venezuela las normas que regulan la calidad del agua no requieren que los sistemas de tratamiento hagan pruebas para determinar si hay *Cryptosporidium* sp. en éstas (22), a diferencia de otros países desarrollados como Estados Unidos (12), España (23), e Italia (5) entre otros, en los cuales se están considerando varias opciones para regular la presencia de este parásito. Este aspecto resulta de vital importancia tomando en consideración que las bacterias indicadoras de contaminación no son buenas indicadoras de la calidad parasitológica del agua, por lo que podría estarse empleando para los fines ya mencionados, agua contaminada con microorganismos patógenos y ante esta situación es la población con menos recursos económicos la que se ve más fuertemente impactada.

Sin embargo, es difícil regular la presencia de *Cryptosporidium* sp. en el agua cuando no existen métodos analíticos que de forma viable y precisa puedan detectar su presencia. Por lo que, dada las ventajas que ofrece la técnica de Kinyoun, en términos de facilidad de aplicación, rapidez y costos, se sugiere su aplicación como técnica de rutina para la evaluación de *Cryptosporidium* sp. en muestras de agua residual.

En virtud del valor del agua en términos sanitarios, económicos y ecológicos, y tomando en cuenta el papel primordial que juega el agua contaminada como vehículo transmisor de microorganismos causantes de enfermedades, se hace necesario el monitoreo periódico de su calidad y para ello es primordial que los organismos estatales encargados de la dispo-

sición, tratamiento y saneamiento de las aguas y de la salud pública, cuenten con técnicas apropiadas que le permitan llevar a cabo de una manera sencilla y económica estos análisis en pro del beneficio de la colectividad. En este trabajo se demuestra la eficacia del empleo de la técnica de coloración permanente de Kinyoun para la detección de *Cryptosporidium* sp. en aguas residuales.

Los resultados obtenidos en esta investigación, pueden servir de base para futuros estudios relacionados a establecer el riesgo microbiológico de las concentraciones de ooquistes de *C. parvum* encontradas en este tipo de aguas, las cuales pueden ser empleadas posteriormente con fines de irrigación, así como la probabilidad de adherirse a la superficie de frutas y hortalizas frescas, lo cual representan un verdadero riesgo a la salud pública.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo financiero otorgado por el Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT), al Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) y al Instituto para la Conservación y Control de la Cuenca del Lago de Maracaibo (ICLAM), por permitir el acceso para la toma de muestras en la Planta de Tratamiento Sur de Maracaibo.

Referencias Bibliográficas

- (1) León, G. Procesos de Tratamiento de Aguas Residuales, Objetivos y Selección de Tecnologías en función al tipo de Reutilización. Congreso Venezuela de Ingeniería Agrícola. Maracaibo-Estado Zulia. Venezuela.1995.
- (2) Cifuentes, E.; Gómez, M.; Blumenthal, U.; Tellez-Rojo, M.; Romieu, I.; Ruiz-Velazco, S. Risk factors for *Giardia intestinalis* infection in agricultural villages practicing wastewater irrigation in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62(3): 388-392.
- (3) Carraro, E.; Salva, S.; Gill, G. Impact of wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cyst occurring in surface water. *Wat Sci Tech* 2000; 14(7): 31-37.
- (4) Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del ambiente (CEPIS). "Proceso de tratamiento de aguas residuales, Objetivos y Selección de Tecnologías en Función al tipo de reutilización". Publicaciones CEPIS. Lima-Perú. 1995.
- (5) Caccio S, De Giacomo M, Aulicino F y Pozio E. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Appl Environ Microbiol* 2003;(69):3393-3398.
- (6) Alarcón, M.; Beltrán, M.; Cárdenas, M.; Campos, M. Recuento y determinación de viabilidad de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en aguas potables y residuales en la cuenca alta del río Bogotá. *Biomédica* 2005; 25: 353-65.
- (7) Ruecker N, Braithwaite S, Topp E, Edge T, Lapen D, Wilkes G, Robertson W, Medeiros D, Sensen C, y Neumann N. Tracking Host Sources of *Cryptosporidium* spp. in Raw Water for Improved Health Risk Assessment. *Appl Environ Microbiol* 2007; 13(12):3945-3957.
- (8) Graczyk, F.; Lucy F. Quality of reclaimed waters: a public health need for source tracking of wastewater-derived protozoan enteropathogens in engineered wetlands. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101: 532-533.
- (9) Reynolds, K. OMS-Elaborando guías de calidad de agua para el mundo. *Agua Latinoamérica*. 2003. Vol. Marzo / Abril: 17-20.
- (10) Millar, S.; Rosario, C.; Rojas, E.; Scorza, J. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centers in Trujillo, Venezuela. *Trop Med Int Health* 2003; 8:346-347.
- (11) Feng, Y.; Ong, S.; Hu, J.; Song, L.; Tan, X.; Ng, W. Effect of particles on the recovery of *Cryptosporidium* oocysts from source water samples of various turbidities. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(4):1898-1903.

- (12) Environmental Protection Agency U.S.-EPA. Proposed Rules. Fed Regist 2000; 65(91):30193-30274.
- (13) Forbes, B.; Sahm, D.; Weissfel, A. Diagnostic Microbiology. Mosby. ST. Luis Missouri. 1998.
- (14) Rosillo, A. Sistemas Integrados de Tratamiento y su Uso de Aguas residuales en América -Latina. Realidad y Potencial. [Http://www.cepis.ops.oms.org/bvsaar/e/proyecto/generales/casos/Maracaibo.pdf](http://www.cepis.ops.oms.org/bvsaar/e/proyecto/generales/casos/Maracaibo.pdf). 2001.
- (15) Instituto para la Conservación del Lago de Maracaibo (ICLAM) 2000. Gerencia de Ingeniería Ambiental. Resumen del Sistema de Tratamiento Sur. www.iclam.sov.ve
- (16) Haas, C.; Rose, J. Developing an action level for *Cryptosporidium*. JAWWA 1995;87: 81-84.
- (17) Betancourt, W.; Rose, J. Drinking Water Treatment Processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. Veter Parasitol 2004; 126:219-234.
- (18) Rincón, W.; Acurero, E.; Serrano, E.; Quintero, M.; Beauchamp, S. Enteroparásitos asociados a diarrea aguda en niños menores de 12 años de edad. Kasmera 2006; 34:31-39.
- (19) Ríos-Calles, G.; Rossel, M.; Cluet, I.; Álvarez, T. Frecuencia de parasitosis en niños con diarrea. Kasmera 2004; 32: 89-100.
- (20) Rincón, W.; Calvo, B.; Heredia, M. Enteroparasitosis en niños menores de 5 años con diarrea. Estudio de la relación causal. Kasmera 1995; 23:1-26.
- (21) Díaz, O.; Calvo, B.; Carchi, M. Prevalencia de criptosporidiasis en niños menores de 6 años y su relación con los factores de riesgo. Kasmera 1996; 24: 93-116.
- (22) Gaceta Oficial de la República de Venezuela. Caracas, 18 de Diciembre de 1995. N° 5.021, Año CXXIII - Mes III.
- (23) Carmena, D.; Aguinagalde, X.; Zigorraga, C.; Fernández-Crespo, J.; Ocio, J. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. J. Appl. Microbiol 2007. 102 (3): 619-629.