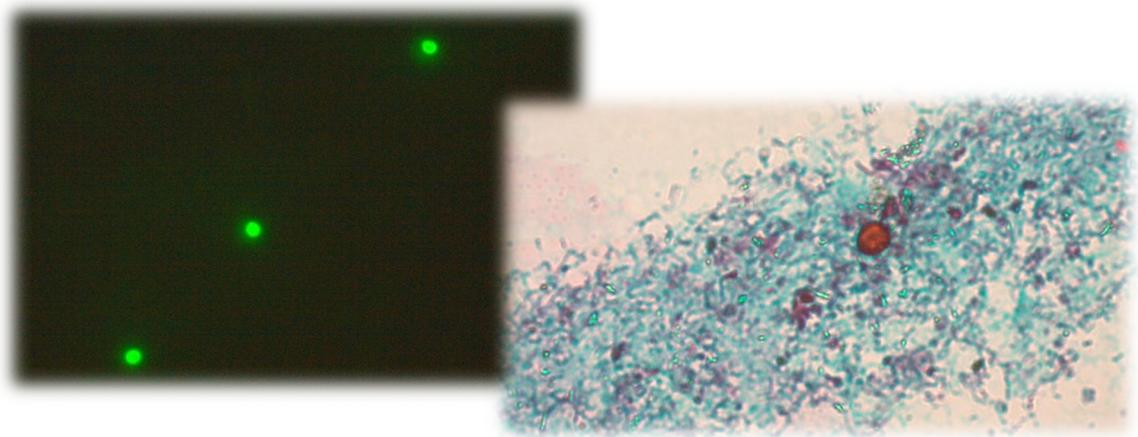




DETECCIÓN DE
CRIPTOSPORIDIUM SPP EN
LECHUGAS CULTIVADAS EN LA
CUENCA DEL RÍO SANTA LUCÍA

INFORME DE PASANTÍA DE LA CARRERA
TECNÓLOGO QUÍMICO



Autora: Narela Aliberti

Tutor académico: Lic. Cesar Iglesias

Tutora empresarial: Ing. Alim. Msc. Paula Mussio

Diciembre 2017

INDICE

INDICE.....	2
SECCIÓN I: INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. PRESENTACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
1.2. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
SECCIÓN II: DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA DONDE FUE REALIZADA LA PASANTÍA.....	5
1.4. ACERCA DE LATU.....	5
2.2. INSTALACIONES.....	5
2.3. MISIÓN Y VISIÓN.....	6
2.4. ACREDITACIONES.....	6
SECCIÓN III: MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
3.1. INTRODUCCIÓN.....	7
3.2. CLASIFICACIÓN.....	7
3.3. ¿QUÉ ES LA CRYPTOSPORIDIOSIS?.....	8
3.4. TRANSMISIÓN.....	9
3.5. CICLO BIOLÓGICO.....	9
3.6. ¿QUIÉN PUEDE CONTRAER CRYPTOSPORIDIOSIS?.....	11
3.7. SINTOMATOLOGÍA.....	11
3.8. DOSIS INFECTIVA.....	11
3.9. VIABILIDAD DEL OOQUISTE.....	12
3.10. MÉTODOS DE DETECCIÓN.....	12
3.11. MÉTODOS DE DETECCIÓN EMPLEADOS.....	13
3.12. TINCIÓN ZIEHL NEELSEN MODIFICADO.....	13
3.13. TINCIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.....	14
3.14. DETECCIÓN MEDIANTE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) ANIDADO.....	15
SECCIÓN IV: PLANIFICACIÓN DE ACTIVIDADES.....	17
SECCIÓN V: MÉTODOS Y MATERIALES.....	19
5.1. MATERIALES Y REACTIVOS.....	19
SECCIÓN VI: PUESTA A PUNTO DE LAS METODOLOGÍAS.....	22
6.1. PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES DE OOQUISTES DE TRABAJO.....	22
6.2. PRUEBA TINCIÓN ZN.....	24
6.3. PRUEBA TINCIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.....	28

6.4.	APLICACIÓN DE METODOLOGÍAS EN MATRICES DE ESTUDIO	30
	SECCIÓN VII: VALIDACIÓN.....	43
7.1.	PLAN DE VALIDACIÓN, MATRIZ: LECHUGA	43
7.1.1.	INFORME DE VALIDACIÓN.....	44
7.2.	PLAN DE VALIDACIÓN, MATRIZ: AGUA	45
7.2.1.	INFORME DE VALIDACIÓN.....	46
	SECCIÓN VIII: MUESTREO.....	48
8.1.	MUESTREO ESTABLECIMIENTO N°1.....	49
8.2.	MUESTREO ESTABLECIMIENTO N°2	50
	SECCIÓN IX: PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	51
9.1.	MUESTRAS DEL ESTABLECIMIENTO N°1.....	51
9.1.1.	ENSAYO DE LAS MUESTRAS.....	51
9.1.2.	RESULTADOS OBTENIDOS	52
9.2.	MUESTRAS ESTABLECIMIENTO N°2	58
9.2.1.	ENSAYO DE LAS MUESTRAS.....	58
9.2.2.	RESULTADOS OBTENIDOS	59
9.3.	COMPARACIÓN DE RESULTADOS	66
	CONCLUSIÓN	68
	AUTOEVALUACIÓN	69
	BIBLIOGRAFÍA	70
	ANEXO I: PLAN DE SEGURIDAD	72
	ANEXO II: DATOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTO DE DATOS	74
	ANEXO III: PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	82
	ANEXO IV: GALERÍA DE IMÁGENES DEL PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	85

SECCIÓN I: Introducción

1.1. Presentación de la investigación

Dentro de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), se encuentran aquellas causadas por formas parasitarias a través del consumo de frutas y hortalizas, contaminadas con la llegada del protozoo al medio ambiente por diversas vías. Un ejemplo, es el caso de *Cryptosporidium spp*, el cual tiene una forma infecciosa de ooquiste que es liberado al ambiente a través de la materia fecal de animales infectados.

Debido a la resistencia que presentan estos ooquistes a las formas convencionales de desinfección, aplicadas tanto en alimentos de consumo crudo como en agua potable. Y a su capacidad de parasitar el trazo gastrointestinal y producir severos problemas de salud en personas inmunodeprimidas, especialmente portadores de VIH, niños pequeños y ancianos, la búsqueda de *Cryptosporidium spp* ha comenzado a presentarse como una necesidad a nivel mundial.

El presente trabajo plantea identificar la existencia de ooquistes de *Cryptosporidium spp* en lechugas cultivadas en los alrededores de la cuenca del río Santa Lucía, mediante la aplicación de la metodología más adecuada para dicha matriz. A su vez, también se plantea el estudio de las aguas de riego utilizadas para dichos cultivos, de modo de poder establecer si son una posible fuente de contaminación.

1.2. Objetivo general

Determinar si existe contaminación por ooquistes (forma infecciosa) de *Cryptosporidium spp* en lechugas (*Lactuca sativa*) cultivadas con diferentes sistemas de riego en los alrededores de la cuenca del río Santa Lucía.

1.3. Objetivos específicos

- Puesta a punto de las técnicas a emplear de acuerdo a los recursos e instalaciones del laboratorio
- Determinación de la aplicabilidad de las técnicas seleccionadas a las matrices de estudio (lechuga y agua de riego)
- Validación de las técnicas para asegurar resultados confiables
- Muestreo en establecimientos cultivadores en la zona seleccionada y posterior procesamiento y ensayo de muestras

- Comparación de eficacia de técnicas y evaluación de la viabilidad de su uso como metodologías rutinarias.

SECCIÓN II: Descripción de la empresa donde fue realizada la pasantía

1.4. Acerca de LATU



El Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) es una organización de derecho público no estatal, creada en el año 1965 para la prestación de servicios orientados a la cadena productiva. Es administrado a través de un directorio integrado por un representante del Poder Ejecutivo (MIEM), que ocupa la presidencia; y dos representantes, uno de la Cámara de Industrias del Uruguay (CIU) y otro del Banco República (BROU), en calidad de directores.

El Estado ha confiado en el LATU para la certificación de productos, como alimentos y juguetes, para el control medioambiental o el de los regímenes de promoción industrial. La capacidad analítica del LATU le permite brindar servicios medioambientales a la industria y asegurarles a las autoridades públicas competentes información sobre el grado de cumplimiento, por parte de los obligados, de los estándares nacionales o internacionales cuando corresponde.

2.2. Instalaciones

El predio del LATU en Montevideo ocupa 28 hectáreas, con 46300 m² construidos. Las instalaciones incluyen el edificio principal, 14 módulos con laboratorios, plantas piloto y el Parque Tecnológico con sus 5 centros.

A su vez cuenta con una Unidad en Fray Bentos, diseñada con el propósito de contribuir a las investigaciones y así fomentar el desarrollo tecnológico del país.

política de salud y seguridad ocupacional, el LATU mantiene la certificación de su sistema de gestión de salud y seguridad ocupacional otorgada por SQS en 2015 según los requisitos de la norma OHSAS 18001. (1)

- Ésta pasantía fue realizada en el departamento de Microbiología del LATU (módulo 6).

SECCIÓN III: Marco teórico de la investigación

3.1. Introducción

Cryptosporidium spp., protozoo descrito originalmente en 1907, es un parásito epitelial, monoxeno con varias especies, considerado un patógeno emergente causante de gastroenteritis en humanos y animales. Los grupos con mayor riesgo de contraer esta parasitosis son los niños, individuos desnutridos y pacientes inmunocomprometidos.

La ingesta de agua contaminada con la forma infecciosa de este parásito, así como alimentos de consumo crudo son de las principales vías para contraer la parasitosis. A su vez, es considerada una zoonosis por el contagio animal-humano al entrar en contacto con heces contaminadas excretadas por animales infectados. (2)

3.2. Clasificación

Inicialmente *Cryptosporidium* fue clasificado en el género de la familia Cryptosporidiidae, suborden Eimeriina, orden Eucoccidiida, subclase Coccidia, clase Sporozoa, phylum Apicomplexa, relacionado taxonómicamente con *Isospora*, *Toxoplasma* y *Sarcocystis*. Recientemente varias investigaciones moleculares y biológicas han descubierto que está más relacionado con los parásitos gregarinos que con los coccidianos. El hallazgo de la capacidad de *Cryptosporidium* de completar su ciclo de vida en ausencia de células hospedadoras, confirma aun más su relación con los gregarinos. Por esto ha sido reclasificado en el grupo de los Gregarinos continuando en el phylum Apicomplexa. (2)

Actualmente se reconocen aproximadamente 26 especies de *Cryptosporidium spp.*, algunas de ellas caracterizadas como: *C. hominis*, encontrado fundamentalmente en humanos; *C. parvum*, en humanos y otros mamíferos *C. andersoni* y *C. bovis*, en ganado vacuno; *C. canis*, en perros; *C. muris*, en ratones; *C. felis*, en gatos; *C. wrairi*, en cobayas; *C. suis*, en cerdos; *C. fayeri*, en canguros rojos; *C. macropodum*, en canguros grises; *C. meleagridis*, en pavos y en humanos; *C. baileyi*, en pollos; *C. gali* en gallinas

adultas y en algunas aves silvestres; *C. varanii*, en lagartos monitores esmeralda; *C. serpentis*, en serpientes y lagartos y *C. molnari* en peces. (3)

- Cuadro 1, algunas diferencias entre las especies del género *Cryptosporidium*. (Adaptado de. (3))

Especies	Dimensiones del ooquiste (μm) http://www.nmnh.si.edu/msw/	Lugar de Infección	Principal hospedador	Infeccioso para humanos
<i>C. hominis</i>	4.5 × 5.5	Intestino delgado	Humanos	SI
<i>C. parvum</i>	4.5 × 5.5	Intestino delgado	Mamíferos de cría neonatos, humanos	SI
<i>C. suis</i>	5.05 × 4.41	Intestino delgado	Cerdos	SI
<i>C. felis</i>	4.5 × 5.0	Intestino delgado	Gatos	SI
<i>C. canis</i>	4.95 × 4.71	Intestino delgado	Perros	SI
<i>C. meleagridis</i>	4.5–4.0 × 4.6–5.2	Intestino	Pavos	SI
<i>C. muris</i>	5.5 × 7.4	Estómago	Roedores	SI
<i>C. andersoni</i>	5.6 × 7.4 (5.0–6.5 × 8.1–6.0)	Estómago	Ganado	No
<i>C. wrairi</i>	4.0–5.0 × 4.8–5.6	Intestino delgado	Cobayas	No
<i>C. bovis</i>	4.7–5.3 × 4.2–4.8	Intestino delgado	Ganado vacuno	No
<i>C. baileyi</i>	4.6 × 6.2	Tráquea, bolsa de Fabricio, cloaca	Aves de corral	No
<i>C. fayeri</i>	4.5–5.1 × 3.8–5.0 (mean 4.9 × 4.3)	Intestino	Canguro rojo (<i>Macropus rufus</i>)	No
<i>C. macropodum</i>			Canguro gris (<i>Macropus giganteus</i>)	No
<i>C. galli</i>	8.0–8.5 × 6.2–6.4	Proventrículo	Pinzones, pollos	No
<i>C. serpentis</i>	5.6–6.6 × 4.8–5.6	Estómago	Reptiles	No
<i>C. varanii</i>	6.3 × 5.5	Intestino	Lagarto monitor esmeralda (<i>Varanus prasinus</i>)	No
<i>C. molnari</i>	4.72 × 4.47	Intestino	Pez (dorada)	No
<i>C. scophthalmi</i>	3.7–5.0 × 3.0–4.7 (media 4.44 × 3.91)	Intestino, muy raras veces en el estómago	Pez (rodaballo)	No

3.3. ¿Qué es la Cryptosporidiosis?

La criptosporidiosis es una enfermedad cosmopolita, con mayor incidencia en zonas con clima tropical o templado, generada por la ingesta de la forma infecciosa del parásito *Cryptosporidium*, la cual afecta el tracto digestivo de animales vertebrados incluyendo al hombre.

En países en desarrollo, en los que prevalece una sanidad deficiente y hacinamiento, es más frecuente la transmisión oral-fecal, directa o indirecta, con brotes a nivel familiar o institucional, con factores significativos como la ingesta de agua no potable y las zoonosis.

La prevalencia de la enfermedad en países industrializados oscila entre 0.1 y 27.1%, con una media de 4.9%, mientras que en países en desarrollo los resultados varían entre 0.1 a 31.5% con una media de 7.9%, excluyendo los brotes epidémicos específicos y a los sujetos con SIDA.

En países con mayor desarrollo, la parasitosis se presenta principalmente en la forma de brotes epidémicos debidos a fuentes de agua contaminada, ya sea redes de agua potable, de superficie o recreativas. (3)

3.4. Transmisión

La transmisión es oral-fecal, por contacto directo de hospedador-hospedador y a través de alimentos o agua contaminados con ooquistes, infectantes al momento de ser eliminados con la materia fecal del hospedero.

Entre las prácticas más probables para aumentar la difusión de la criptosporidiosis están la cría de terneros, aves, cabritos y corderos caseros y la alimentación y la cría comunal de neonatos, donde los animales jóvenes susceptibles están en contacto unos con otros y con las heces de animales infectados. De forma similar, la eliminación de las heces, el abono de granjas u otros desechos contaminados acumulados sobre el terreno, cuando van seguidos de períodos de lluvias persistentes, puede provocar la contaminación del curso del agua por los ooquistes de *C.parvum*. Estas trayectorias se pueden utilizar como fuente de agua para otros animales, de riego para plantaciones y de agua potable para el consumo humano. Los desechos contaminados incluyen tanto productos líquidos como sólidos derivados de la cría de animales. (4)

3.5. Ciclo biológico

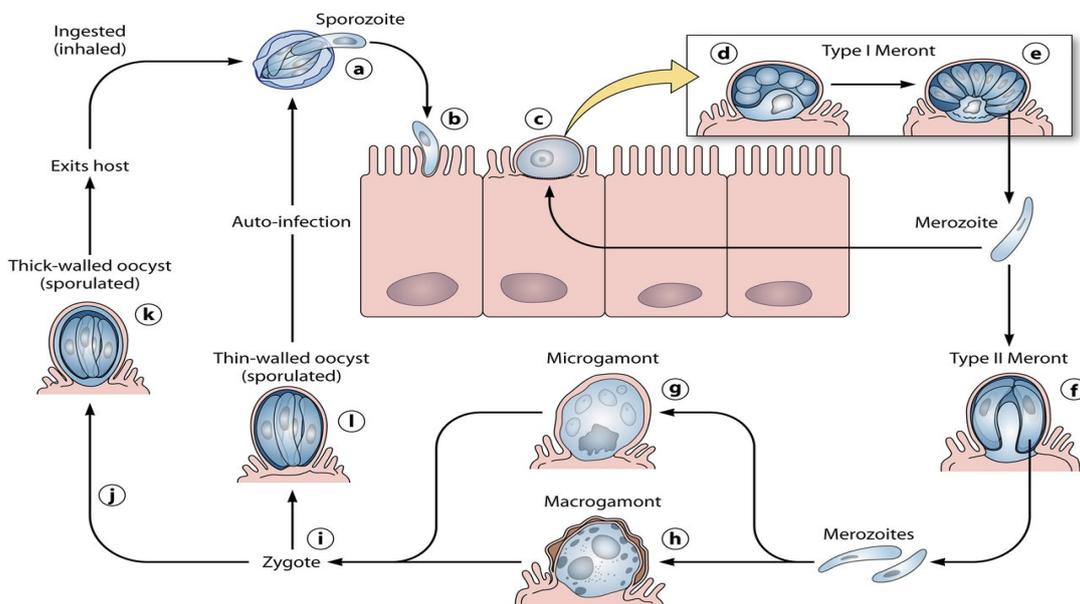
El ciclo de vida de este protozoo consta de etapas asexuadas y sexuadas para culminar la formación del ooquiste, elemento infectante de esta parasitosis. Este ooquiste tiene forma esférica, mide de 4 a 6 μm de diámetro y contiene 4 esporozoitos en su interior.

Al ingresar por vía oral al tracto digestivo, por la acción del ácido clorhídrico y enzimas digestivas, se liberan estos esporozoitos a través de una ranura en los ooquistes, colonizando las células epiteliales. Estos esporozoitos poseen un complejo apical, auxiliar en la adhesión a la membrana celular del hospedero, que envuelve las formas invasivas del parásito y da lugar a una vacuola parasitófora. Esta vacuola, que engloba al esporozoito en un nicho protector especial extracitoplásmico (epicelular), presenta una región electrodensa en la base, denominada organelo de alimentación o epimerita, el cual protege al parásito del ambiente hostil del intestino y lo provee de energía y nutrientes de la célula del hospedero.

Las dos primeras etapas de multiplicación son asexuadas. En un comienzo, el esporozoito se transformará en trofozoito, que constituirá el meronte I conteniendo de seis a ocho merozoitos en su interior, los cuales se liberan e invaden otras células con repetición del ciclo y formación de nuevos merontes I. Posteriormente, estos

merozoitos ingresan a nuevas células y se constituye el meronte II que contiene cuatro merozoitos. Los merontes II se liberan al lumen y no reciclan, ingresan a nuevas células e inician la etapa sexual de este ciclo. Algunos de ellos se diferencian en gametos masculinos o microgametocitos y en gametos femeninos o macrogametocitos. Los microgametocitos son liberados y por su movilidad van a fecundar, cada uno de ellos, a un macrogametocito y forman el cigoto, del cual se desarrolla el ooquiste, que esporula en la vacuola parasitófga, complementando así el ciclo de vida. (4)

Los ooquistes son eliminados con la materia fecal, y son infectantes para otras personas o animales. *Cryptosporidium* presenta dos tipos funcionales de ooquistes: los primeros, de pared gruesa con 4 esporozoitos en su interior, los cuales pasan por el intestino sin alterarse y son eliminados con la materia fecal siendo los responsables de la transmisión de la enfermedad (representan el 80% de los ooquistes formados); los segundos son de pared delgada con una membrana simple, se rompen rápidamente después de la salida de la célula que los contiene y corresponden a las formas autoinfectantes, los cuales no se recuperan en las materias fecales. Estos últimos liberan esporozoitos, originando el ciclo endógeno, en el cual los ooquistes formados invaden los enterocitos causando la re infección y junto con la presencia de merontes I que reciclan, son responsables de la enfermedad crónica que dura meses o años. Esto sugiere que el parásito puede experimentar múltiples ciclos de esquizogonia, al menos en inmunodeficientes. (5)



- Esquema del ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. (2)

3.6. ¿Quién puede contraer *Cryptosporidiosis*?

Cualquier persona puede contraer la infección sin distinción de sexo, pero se ve una especial susceptibilidad en niños menores de 2 años, probablemente debido al mayor riesgo de transmisión oral-fecal, a la falta de inmunidad protectora por exposiciones anteriores y a la relativa inmadurez inmunológica. En países pobres es una causa relativamente importante de desnutrición y muerte infantil. En ancianos aumenta también el riesgo de padecer la infección por el deterioro inmunológico, así como en las personas inmunocomprometidas. (6).

3.7. Sintomatología

La sintomatología de la criptosporidiosis es variada y su forma de presentación guarda reacción principalmente con la competencia inmunológica del paciente.

- Criptosporidiosis en pacientes inmunocompetentes: durante los primeros tres días los pacientes presentan anorexia, náuseas y vómitos en el 60% de los casos, febrículas e incluso fiebre de hasta 38.5°C en la mitad de ellos. La diarrea es de mal olor, puede ser profusa, con una frecuencia variable de tres a doce deposiciones en el día, su duración oscila entre los siete y doce días.
- Criptosporidiosis en pacientes inmunocomprometidos: la mayor experiencia acumulada es en pacientes con SIDA, en los que se presenta una disminución en los linfocitos CD4 causando que la criptosporidiosis se vuelva crónica, en la cual los pacientes no pueden liberarse del parásito. En estos pacientes se observa compromiso del estado general y baja de peso importante, acompañado a un cuadro diarreico severo. Puede comprometer otros órganos como el aparato respiratorio. (4)

3.8. Dosis infectiva

Estudios de infectividad utilizando *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* aislados en los seres humanos se han llevado a cabo y muestran que, si bien se producen diferencias entre los aislados, la dosis infecciosa es baja. El ID₅₀ más bajo (es decir, el número de ooquistes necesarios para causar infección en el 50% de las personas expuestas) para *Cryptosporidium parvum* fue de 9 ooquistes y para *Cryptosporidium hominis* 10 ooquistes. Sin embargo, el ID₅₀ no es una medida de la mínima dosis infecciosa y es ampliamente aceptado que, de acuerdo con amplios estudios en animales y modelos matemáticos de infecciones experimentales, un solo ooquiste podría infectar y causar enfermedad en algunas personas susceptibles. (5)

3.9. Viabilidad del ooquiste

Gracias a su pared gruesa, los ooquistes de *Cryptosporidium* resisten los tratamientos químicos usuales: no sufren alteración después de ser expuestos a 80 ppm de cloro/30 min, e incluso pueden tolerar 24 h en el cloro utilizado para blanqueado de ropa. El empleo de ozono (1 ppm x 5 min), la congelación o calentamiento (>72° C durante 1 min ó 45 °C por 10 min después de iniciada la ebullición) son métodos más efectivos. Permanecen viables al cabo de una semana en la mayoría de los congeladores caseros. Debido a su tamaño, únicamente los filtros capaces de remover partículas de 1 µm resultan confiables.

Son muy resistentes a las condiciones climáticas pudiendo permanecer viables de dos a seis meses a 4 ° C en el ambiente.

Debida a esta resistencia a los métodos de cloración usuales, es que pueden encontrarse en los suministros de agua potable incompletamente filtrados, ya que la concentración requerida de cloro para que el agua continúe siendo potable es inefectiva contra el ooquiste, así como en piscinas donde el nivel de filtración aplicado no es suficiente.

Así mismo, es muy sensible a la desecación y a la congelación, haciendo que permanezca viable por largos períodos de tiempo en ambientes húmedos, favoreciendo las épocas lluviosas del año a su proliferación. (5)

3.10. Métodos de detección

La detección de ooquistes en laboratorios suele basarse en el examen microscópico de las muestras previamente tratadas, tras la aplicación de técnicas convencionales de tinción, como la tinción ácido alcohol resistente mediante los métodos de Kinyoun en frío o caliente o Ziehl Neelsen modificado (con ambos se obtienen ooquistes teñidos de color rojo-fucsia). También se utilizan kits (ELISA) para la identificación de coproantígenos e inmunofluorescencia (IFA).

El examen microscópico no es suficiente para diferenciar especies de *Cryptosporidium* por su similitud en la morfología entre los ooquistes, los cuales son lisos con pared celular gruesa, de forma esférica o ligeramente ovoide que cuando están desarrollados (esporulados) contienen cuatro esporozoitos alargados libres (no contenidos en un esporocisto) y un cuerpo citoplasmático residual. El tamaño oscila entre los 4 a 6 µm.

Se han desarrollado diferentes técnicas de PCR para la detección y diferenciación de *Cryptosporidium* spp. a nivel de especie/genotipo y subtipos tras la secuenciación de los productos de amplificación a zonas genéticas definidas. (7)

3.11. Métodos de detección empleados

Para la presente investigación, se seleccionaron tres métodos cualitativos de detección con el fin de determinar el más apropiado para la matriz de estudio y el más efectivo como método de análisis de rutina. Los mismos se describen a continuación:

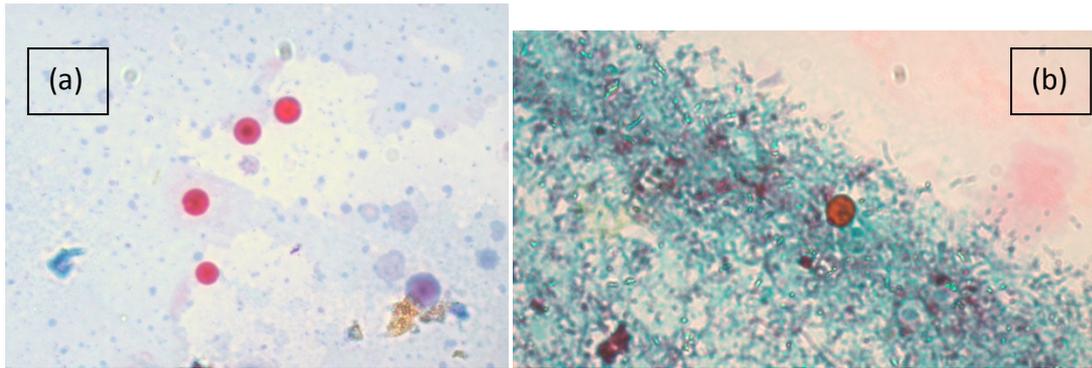
3.12. Tinción Ziehl Neelsen modificado

Esta tinción es útil para visualizar quistes de protozoos intestinales que tienen la propiedad de ser ácido alcohol resistentes (AAR). Esta resistencia se debe a la estructura de la pared celular, la cual está compuesta por una abundante concentración de ácidos grasos denominados ácidos micólicos de cadena larga (de 50 a 90 átomos de carbono) que les confiere la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido luego de la tinción con un colorante básico primario (fucsina básica).

La coloración clásica de Ziehl Neelsen requiere calentamiento para que el colorante atraviese la pared celular que contiene ceras, al suspender el calor y enfriar con agua se produce una nueva solidificación de los ácidos grasos de modo que el colorante queda retenido. En esta versión modificada, el calor es suplantado por el agregado de una alta concentración de fenol junto con el colorante primario fucsina, generando que se disuelvan los lípidos de las paredes celulares y permitiendo así que el colorante primario entre en contacto con los ácidos carboxílicos y forme el complejo ácido-alcohol resistente.

El proceso de coloración se basa en una primera tinción con fucsina básica fenicada por no menos de 15 minutos seguido de un enjuague con agua y posterior aplicado del decolorante alcohol-ácido. Por último se agrega un segundo colorante, verde de malaquita, para generar una coloración de contraste.

Los ooquistes se observan teñidos de un color rojo-fucsia sobre un contraste de color verde azulado. (8)



- (a) Tinción realizada a la suspensión de ooquistes comercial y (b) tinción realizada a una lechuga inoculada con ooquistes.

Para la aplicación de esta tinción se tomó como referencia el método al. (3) y el método propuesto por Tananta al. (9)

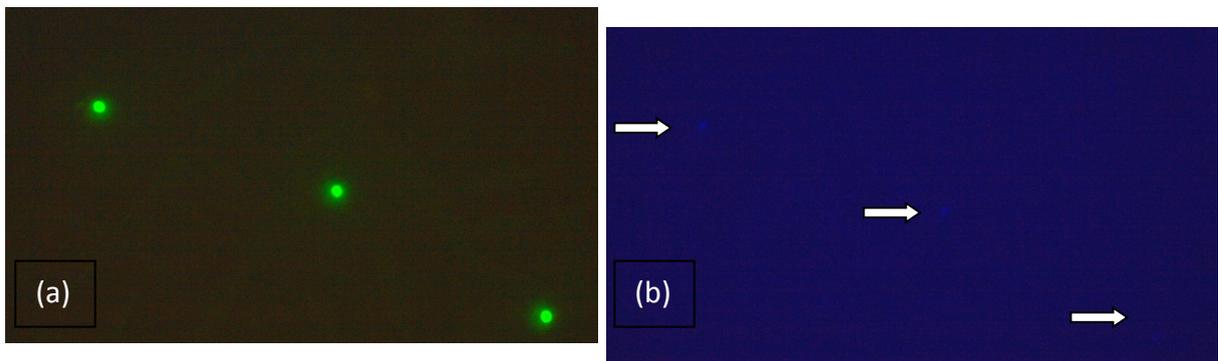
3.13. Tinción por inmunofluorescencia directa

Este tipo de técnica se basa en el uso de un anticuerpo (monoclonal o policlonal) unido químicamente a un colorante fluorescente (fluorocromo) el cual se une al antígeno sujeto de estudio y lo hace visible bajo la luz ultravioleta en un microscopio de fluorescencia. (10)

Para la aplicación de esta técnica se tomó como referencia la norma estadounidense EPA Method 1622 “*Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA”, al. (11) , en el cual establece un método para la determinación de *Cryptosporidium* en muestras ambientales de agua a través de concentración, inmunoseparación magnética (IMS) y tinción por inmunofluorescencia directa. Ya que la aplicación de dicho método en su totalidad se hace inviable a nivel de costos, se optó por tomar como referencia las pautas para la realización de la tinción de interés, así como la guía para la preparación de las suspensiones patrón de ooquistes.

Para realizar la tinción por inmunofluorescencia se utilizó Crypt-a-Glo™ Comprehensive Kit, el cual es un reactivo que consiste en un anticuerpo monoclonal de ratón marcado con fluoresceína (FITC) para a sitios antigénicos de pared externa de los ooquistes (epítomos) de *Cryptosporidium parvum*. En combinación se utilizó el marcador fluorescente (incluido en el kit) DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), el cual se une fuertemente a regiones enriquecidas con timina y adenina para marcar así el ADN y comprobar la presencia de los esporozoitos internos, manifestando la viabilidad del ooquiste. (12)

Los ooquistes se observaron de color verde manzana flúor bajo el filtro para FITC a 470 nm, y la presencia de ADN bajo el filtro UV para DAPI a 365 nm se observó de color azul-celeste flúor, utilizando el microscopio fluorescente Axio Lab A1.



- Tinción realizada a suspensión del control positivo del kit. En (a) se observan los ooquistes bajo el filtro para FITC, y en (b) se aprecian los 4 puntos interiores en representación del ADN de los esporozoitos de los ooquistes representados en (a).

3.14. Detección mediante PCR (Polymerase chain reaction) anidado

La PCR anidada (Nested PCR) es una variante de la PCR convencional (a tiempo final) la cual consiste en dos rondas de amplificación con distintos pares de primers cada una. Es empleada con el fin de incrementar la sensibilidad y especificidad de la detección. Se realiza una primera reacción con primers externos para amplificar una región más extensa de ADN, la cual contiene el segmento diana. Luego, este producto de amplificación se utiliza como molde para la realización de una segunda PCR con primers internos y así amplificar la región específica. (17)

La aplicación de este método fue basada en el artículo publicado por la revista del LATU al. (13).

La amplificación correspondió al gen COWP (proteína de la membrana externa de la pared del ooquiste), para ello se emplearon los primers BcowpF (5'-ACC GCT TCT CAA CAA CCA TCT TGT CCT C-3') y BcowpR (5'-CGC ACC TGT TCC CAC TCA ATG TAA ACC C-3') para el primer round y los primers Cry-15 (5'-GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G-3'), y Cry-9 (5'-GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G-3') para el segundo round, estos permiten una amplificación de un fragmento de copia única cowP1. (13)

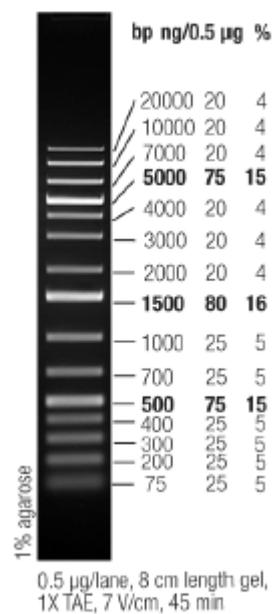
Para la extracción de ADN de los ooquistes de *Cryptosporidium* desde la suspensión comercial (Waterborne, INC.) así como desde las muestras, se los sometió a ciclos de congelado-descongelado en baño de hielo seco y etanol en presencia de buffer de lisis estéril. Luego se realizó un tratamiento térmico a 70°C en presencia de Lisozima,

Proteinasa K y RNasa A. Finalizado el tratamiento térmico con las enzimas se hizo precipitar el ADN mediante la adición de etanol para luego proceder a la etapa de purificación con el kit de la columna QIAGEN.

Concluida la etapa de extracción se cuantificó el ADN a través del instrumento fluorometrico Qubit.

Los producto de PCR fueron revelados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con el compuesto Gel-Red y el marcador de peso molecular utilizado fue Gene Ruler 1kb Plus ADN Ladder.

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder

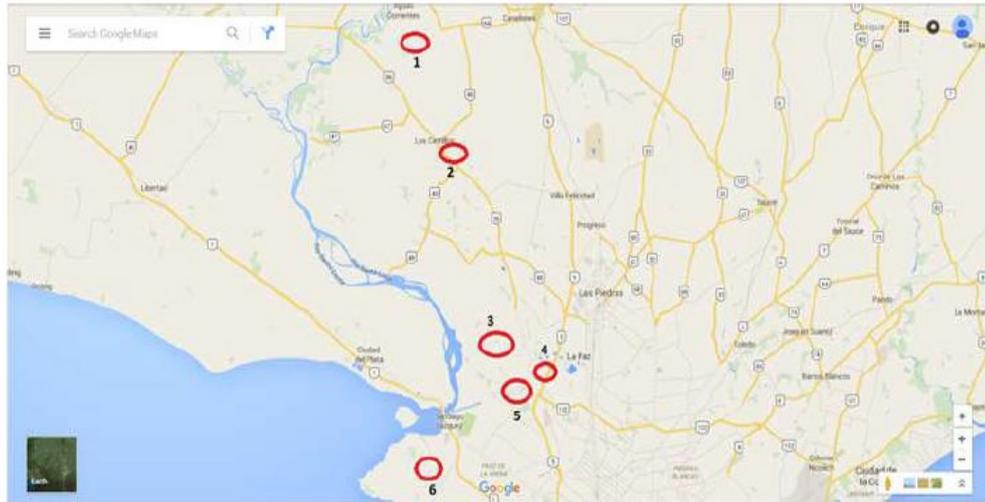


➤ Imagen adaptada de. (14)

Sección IV: Planificación de actividades

A continuación se detallan las actividades que fueron planificadas para el cumplimiento de los objetivos específicos de la presente investigación:

1. Estudio bibliográfico de metodologías existentes, relevamiento de insumos y cotizaciones. Compra de reactivos necesarios.
2. Evaluación del riesgo de bioseguridad y establecimiento de un plan para la adecuada manipulación del material contaminado y posterior descarte.
3. Puesta a punto de las técnicas a emplear y verificación de su aplicabilidad a las matrices de estudio. Para esto se plantea realizar pruebas de detección con muestras de lechugas y agua de grifo contaminadas artificialmente utilizando un inculo de ooquistes comerciales de *Cryptosporidium parvum* de concentración conocida mediante el recuento de los mismos en cámara de Neubauer.
4. Validación de los métodos de recuperación para las tinciones microscópicas.
Por ser métodos de detección (cualitativos) se plantea determinar el límite de detección como parámetro de validación.
Para esto, se planifica inocular con suspensiones de ooquistes de distinta concentración 4 muestras de lechuga adquiridas comercialmente y 4 muestras de agua de grifo y verificar el número mínimo de ooquistes que pueden ser detectados por el método de concentración por centrifugación para la tinción por Ziehl Neelsen y por el método de concentración por filtración para la tinción por inmunofluorescencia directa.
5. Realización del muestreo.
Extracción de muestras de 3 establecimientos cultivadores de lechuga que presenten distintos sistemas de riego, métodos de obtención y almacenamiento de agua para la cosecha, situados en los alrededores del río Santa Lucia.



De los 6 posibles puntos marcados en el mapa se elegirán 3.

Se muestrearán 12 lechugas y 12L de agua de riego por establecimiento, teniendo un total de muestras brutas de 36 lechugas y 36L de agua para analizar.

Aclaración: las muestras son comprtaidas para la realización de otra investigación dentro del departamento de microbiología.

6. Procesamiento de las muestras.

Las muestras brutas de lechuga se concentran por medio de centrifugación y las de agua de riego por medio de filtración directa.

Primero se aplican las técnicas de observación microscópica y luego se realiza el PCR anidado para poder comparar resultados.

A su vez se realizará el recuento mediante la técnica de número más probable de microorganismos indicadores como coliformes fecales, para determinar si existe una posible contaminación fecal en las muestras de lechuga y poder así establecer una conexión con la eventual presencia de ooquistes infectivos de *Cryptosporidium*.

7. Análisis e interpretación de resultados.

Sección V: Métodos y materiales

5.1. Materiales y reactivos

Concentración de ooquistes por centrifugación

- Bolsas con filtro
- Balanza auxiliar
- Tijeras y pinzas estériles
- Probeta de 100 mL estéril
- Tubos falcon 50 mL
- Rejilla
- Centrifuga
- Pipetas graduadas de 10 mL
- Tubos eppendorf
- Agua destilada estéril
- Vortex

Tinción Ziehl Neelsen

- Ácido sulfúrico 2 %
- Fucsina básica
- Fenol al 80 %
- Verde de malaquita 5%
- Agua destilada
- Porta objetos
- Microscopio óptico
- Aceite de inmersión
- Metanol

Concentración de ooquistes por filtración

- Frascos de 250 mL estériles
- Embudo de filtración estéril
- Bomba de vacío
- Membrana de ésteres de celulosa de 1,2 μm de poro y 47mm de diámetro
- Pinzas estériles
- Tubos falcon de 50 mL
- Vortex
- Tubos eppendorf
- Centrifuga
- PBS (Phosphate Buffered Saline)

- Pipeta automática de 10 mL y tips estériles

Tinción por inmunofluorescencia directa

- Crypt-a-Glo™ Comprehensive Kit
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Cámara húmeda
- Estufa a 37°C (opcional)
- Pipeta automática de 10 a 100 µl
- Tips estériles
- Cubreobjetos
- Microscopio de fluorescencia
- Metanol

Extracción de ADN

- Tubos falcon de 50 mL
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Buffer de lisis estéril
 - 100 mM Tris pH 8
 - 100 mM EDTA
 - 100 mM NaH₂PO₄ 2M
 - NaCl 2M
 - 1% CTAB
- Estufa a 70°C
- Etanol
- Hielo seco
- Lisozima 100 µg/mL
- Proteinasa K 100 µg/mL
- RNasa A 50 µg/mL
- Etanol absoluto
- Kit de purificación
- Columna QIAGEN
 - Buffer AW1, AW2 y AE
- Freezer a -20°C
- Vortex
- Centrífuga
- Cuantificación de ADN extraído
- Instrumento fluorométrico Qubit
- Qubit 1x dsDNA HS Assay Kit

Nested PCR

- Primers BcowpF, BcowpR, Cry-15 y Cry-9
- Enzima puReTaq Ready-To-Go
- Pipeta automática de 0,5 a 10 μ l y de 10 a 100 μ l
- Tips estériles
- Tubos eppendorf
- Agua estéril calidad molecular
- Termociclador (MultiGene OptiMax)
- Revelado de productos de amplificación
- Cubeta para electroforesis horizontal
- Fuente de poder para sistemas de electroforesis
- Gel de agarosa 2%
- TAE 1X
- Gel-red
- Marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb Plus ADN Ladder.
- Loading buffer
- Fuente UV

Recuento de ooquistes

- Cámara de Neubauer
- Solución Tween 20 al 0,01%
- Microscopio óptico
- Pipeta automática 1-10 μ L
- Tips estériles

Recuento de coliformes fecales por NMP

- Tubos con medio de cultivo
 - CLT (Caldo Lauril Triptosa)
 - CBVB (Caldo Bilis Verde Brillante)
 - EC
 - Agua triptonada
- Reactivo de kovacs
- Estufa de incubación a 35°C
- Baño de incubación termostatzado a 44,5°C

Sección VI: Puesta a punto de las metodologías

Previo a iniciar la validación de los métodos seleccionados se decidió realizar una serie de pruebas para determinar si los mismos eran aplicables a una matriz alimenticia ya que usualmente se utilizan para la detección de ooquistes en muestras de materia fecal en el caso de tinción ZN o para muestras de agua ambientales en la tinción por inmunofluorescencia. A su vez se corroboró si el método de PCR anidado del modo en el que estaba descrito para muestras de agua era viable para las muestras de lechuga.

6.1. Preparación de suspensiones de ooquistes de trabajo

Tanto para la puesta a punto de las metodologías, como para las validaciones, se cuenta con una alícuota de una suspensión de ooquistes comercial de *Cryptosporidium parvum* (12), en una concentración inicial de 10^9 oq/10mL .

Para la preparación de suspensiones de concentración intermedia y de trabajo se tomó como referencia la guía propuesta en la sección 11 “Oocyst Suspension Enumeration and Sample Spiking” (11). El mismo indica que la suspensión stock comercial de ooquistes debe ser diluida a una concentración que permita la realización de diluciones de trabajo y el consiguiente recuento por medio de una cámara de Neubauer.

Preparación de suspensiones

La suspensión stock de ooquistes debe ser diluida en agua/Tween 20 al 0,01% a una concentración intermedia que permita contar entre 20 y 50 ooquistes a lo largo de un cuadrado de la cámara de Neubauer, para luego poder hacer una dilución final de trabajo la cual debe utilizarse dentro de las 24 hs posteriores a la enumeración.

Criterio de precisión

Dicho método maneja un criterio de precisión para el recuento de suspensiones de ooquistes el cual se basa en el cálculo de la desviación estándar relativa de la concentración media calculada, el cual debe ser <16% para *Cryptosporidium*. Este criterio está basado en la combinación de RSD de 105 enumeraciones manuales de *Cryptosporidium* realizadas por 20 laboratorios bajo el “Programa de evaluación de desempeño de los protozoo” de la EPA. (11)

De cada dilución se deben contar 6 alícuotas de 10 μ L, para lograr una precisión de conteo óptima. Una vez realizadas las repeticiones debe calcularse el promedio y la desviación estándar para poder establecer el RSD y determinar si cae dentro del criterio de aceptación.

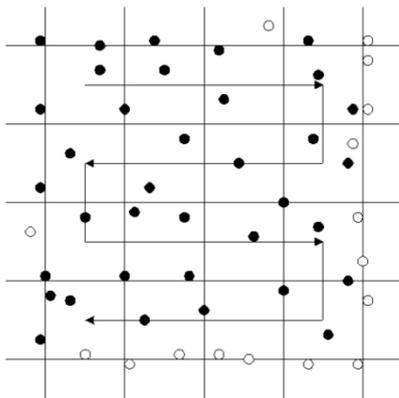
Recuento

Se deben utilizar los 4 cuadrados de 1mm² de las esquinas de la cámara, que a su vez están divididos en 16 cuadraditos de 0,25mm.

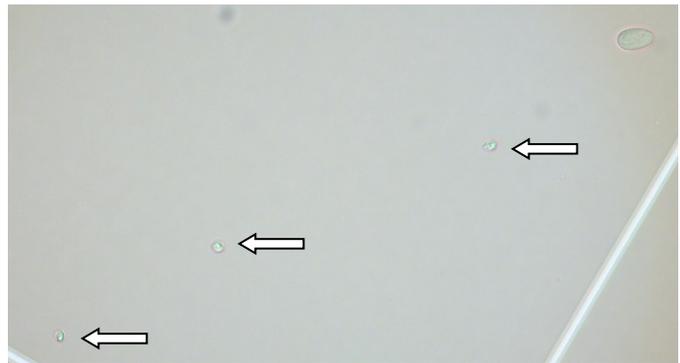
○ Procedimiento

- Mojar los bordes de la cámara con agua, apoyar el cubreobjetos y con movimientos de arriba hacia abajo fijar el vidrio a la cámara a través de los aros de newton evidenciados por la aparición de un “arcoíris”.
- Una vez fijo el cubreobjetos, aplicar los 10μL en la zona de conteo, sin que se formen burbujas ni que volumen del líquido quede fuera. De ocurrir esto volver a empezar.
- Dejar reposar los ooquistes por 2 minutos.
- Enfocar en microscopio con aumento 20X. (Se puede observar con un aumento de 40X para una mejor visualización).
- Contar desde el primer cuadrado superior derecho, de izquierda a derecha la primera fila y de derecha a izquierda la segunda, así sucesivamente. Contar los ooquistes que estén en el borde superior e izquierdo, no los que estén en el derecho e inferior para evitar contar dos veces el mismo quiste.
- Lavar la cámara de Neubauer con agua bajo la canilla, luego con alcohol 70% y por último pasar acetona, de modo de evitar daños en la cuadrícula

Ejemplo de conteo:
parvum en cámara de Neubauer (11)



Vista de ooquiste de *Cryptosporidium*



○ Control de la [susp. Stock]

Previo al preparado de suspensiones de ooquistes para el trabajo con muestras en el laboratorio, se realizó una suspensión intermedia de concentración 10^3 oq/ μ L a partir de la suspensión stock congelada a -80°C de concentración 10^5 oq/ μ L con el fin de confirmar su concentración. Tras el recuento de las 6 alícuotas se obtuvieron los siguientes resultados, los cuales confirman la concentración de la suspensión stock manejada por el proveedor.

Media (oq/ μL)	$2,3 \times 10^3$
Desviación estándar	204,124145
RSD (%)	8,75(<16%)
[Susp. Stock] oq/ μL	$2,3 \times 10^5$

6.2. Prueba tinción ZN

Primero se procedió a preparar los reactivos necesarios para la aplicación de la tinción ZN según método propuesto por (9):

- a. Fucsina básica fenicada
 - Añadir 8g de fucsina básica a 345 mL de agua destilada caliente.
 - Agregar 30 mL de fenol líquido , homogeneizar y filtrar antes de usar
- b. Verde de malaquita 5%
 - Pesar 5g de verde de malaquita y agregar 100 mL de agua destilada. Filtrar antes de usar.
- c. Ácido sulfúrico al 2%
 - Tomar 1,13 mL de ácido concentrado y llevar a 100 mL con agua destilada.

Observación: como en el laboratorio no contábamos con fenol líquido, sólo con fenol en cristales, se pidió al módulo 5 “Análisis de agua y productos químicos” si nos podían compartir fenol líquido. El fenol disponible era diluido a una concentración de 507,77 mg/L, como el necesario para la tinción era prácticamente puro se prosiguió a realizar una prueba para ver si aun así teñía correctamente y se bajaron las cantidades necesarias para preparar la fucsina básica fenicada, quedando la preparación de la siguiente manera:

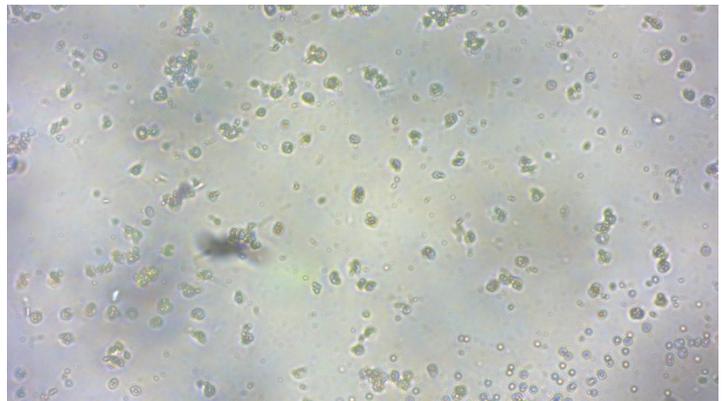
- Pesar 2,3g de fucsina básica y añadir 90 mL de agua destilada caliente

- Agregar 10 mL de fenol líquido

El procedimiento de aplicación de la tinción según la misma bibliografía es el siguiente:

- Colorear frotis con fucsina básica fenicada por 20 min. Lavar con agua destilada. (Preparar el frotis colocando la suspensión en el portaobjetos y dejar secar. Una vez seco aplicar 45 μ L de metanol y dejar secar)
- Decolorar con ácido sulfúrico por 20 min aproximadamente. Lavar con agua destilada.
- Aplicar colorante de contraste verde de malaquita 5% por 5 min, lavar con agua destilada.
- Secar al ambiente

Tras aplicar la tinción a la suspensión de ooquistes se obtuvo el siguiente resultado, donde se observa que los ooquistes no retienen la coloración de la fucsina, ya que no quedan teñidos de rojo-fucsia. Esto es atribuido a dos posibles factores: se deja en contacto con la solución decolorante de ácido sulfúrico por mucho tiempo, o el fenol se encuentra muy diluido y no es capaz de disolver los lípidos de la pared celular de los ooquistes.



Se realiza una segunda prueba donde se modifica el tiempo de contacto con la solución decolorante, pasando de los 20 minutos iniciales a apenas unos segundos. El resultado obtenido fue el mismo que lo observado en la imagen de la primera prueba, por lo que se decide descartar el uso del fenol diluido y realizar una nueva búsqueda bibliográfica para establecer otro procedimiento donde se utilice fenol en cristales.

Tras la nueva revisión bibliográfica se encontró un método donde se mantienen igual todos los reactivos menos la preparación de la fucsina, la cual se prepara de la siguiente manera:

- Pesar 1g de fucsina básica
- Agregar 10 mL de etanol
- Llevar a un volumen final de 100 mL con 90 mL de fenol al 5%

- Preparación del fenol: 5g de fenol en cristales en 100 mL de agua destilada.



Se realiza la misma prueba con la nueva fucsina fenicada y se obtienen resultados similares a los obtenidos con la fucsina anterior, por lo que se decide descartar su uso y realizar una nueva revisión bibliográfica donde se planeen

soluciones de fenol mas concentradas.

Finalmente se encontró el método propuesto por (3), en el cual se plantea el uso de los siguientes reactivos:

- a. Fucsina fenicada fuerte
 - 1g de fucsina en 10 mL de metanol absoluto. Agitar
 - Añadir 6,25 mL de Fenol al 80% p/p (80g de fenol en 100 mL agua destilada)
 - Agregar agua destilada hasta un volumen final de 100 mL
- b. 1% metanol ácido
 - 2 mL HCl en 198 mL metanol
- c. 0,4 % verde de malaquita
 - Tomar 8 mL de solución al 5% y llevar a 100 mL con agua destilada

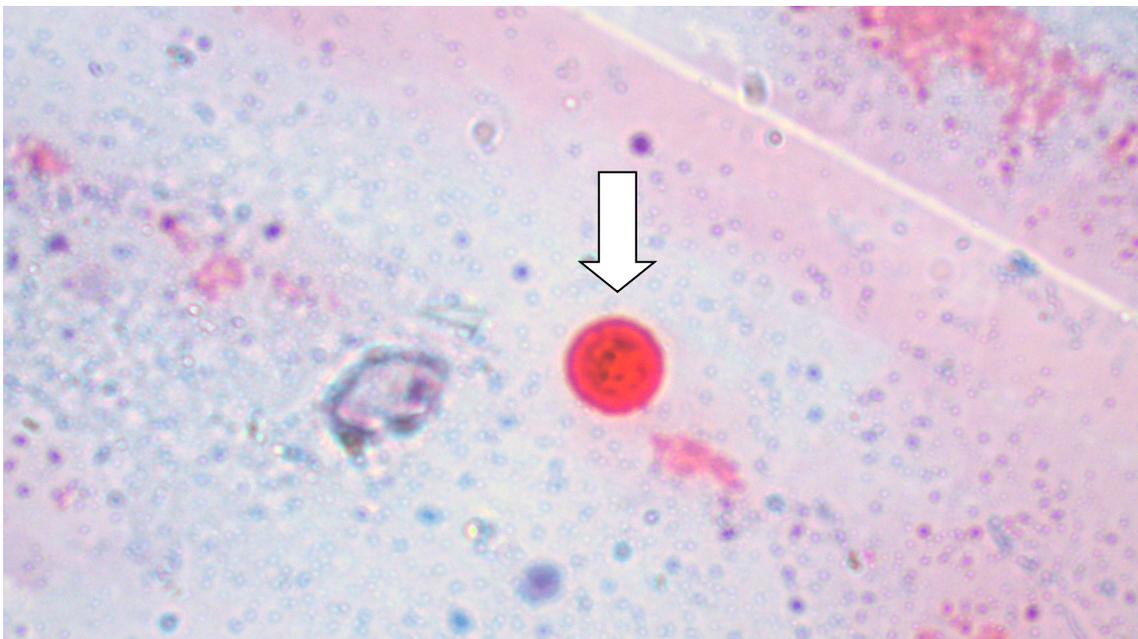
El procedimiento de tinción propuesto es el siguiente:

- Sumergir portaobjetos en fucsina fenicada fuerte en frío y teñir durante 15 minutos.
- Lavar portaobjetos con agua del grifo.
- Decolorar con 1% de metanol ácido durante 10–15 segundos.
- Lavar portaobjetos con agua del grifo.
- Dar coloración de contraste con 0,4% de verde malaquita durante 30 segundos.
- Lavar portaobjetos con agua del grifo.
- Dejar secar al aire



Tras la aplicación de la tinción nuevamente sobre una suspensión de ooquistes se revelan resultados más próximos a los esperados ya que los ooquistes se observan teñidos de color rosado. De todos

modos no es la intensidad de color esperada por lo que se decide hacer una tinción utilizando la nueva fucsina fenicada fuerte, la solución decolorante de ácido sulfúrico al 2% y el verde de malaquita al 5%, obteniendo el siguiente resultado:



En la imagen de la tinción realizada se observa el ooquiste perfectamente teñido, con la intensidad de color buscada, por lo que se decide establecer el siguiente procedimiento para la aplicación de la tinción Ziehl Neelsen:

- Fijar la muestra al portaobjeto. Para esto se debe expandir la muestra sobre el mismo y llevar a estufa por unos minutos hasta su secado, luego agregar 45 μ L de metanol y dejar secar, también puede llevarse a estufa para disminuir el tiempo de secado. Este método de fijación es válido para ambas técnicas de tinción. La etapa de agregado de metanol es esencial para que los ooquistes queden fijos y no se barran con los lavados de las tinciones.
- Cubrir la zona de muestra con fucsina fenicada fuerte y dejar actuar por 25 min.
- Enjuagar con agua de grifo

- Retirar el exceso de fucsina con la solución decolorante de ácido sulfúrico al 2% manteniendo el contacto por unos segundos
- Enjuagar con agua de grifo
- Agregar colorante de contraste verde de malaquita al 5%. Dejar actuar por 15 min.
- Enjuagar exceso con agua de grifo
- Dejar secar portaobjetos
- Observar en microscopio óptico primero a 40X y luego a 100X

6.3. Prueba tinción por inmunofluorescencia directa

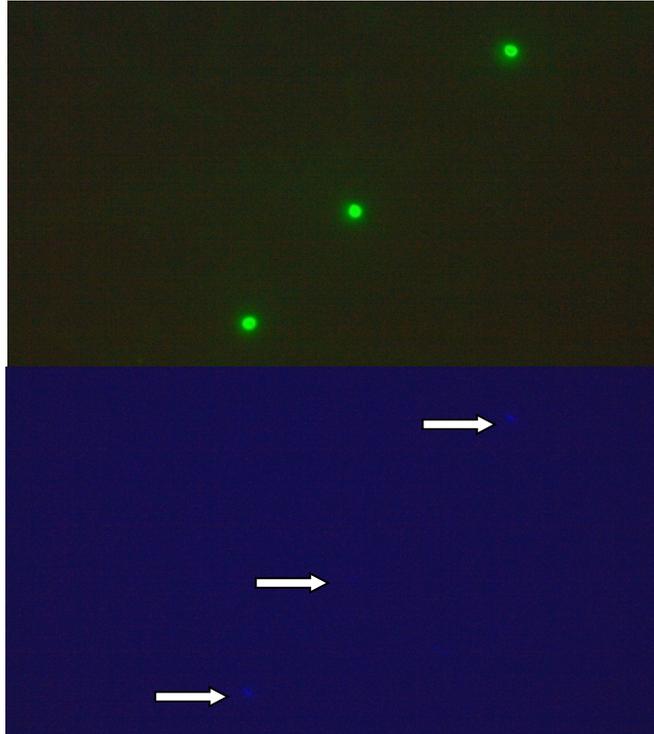
Se realizó una tinción al control positivo del Crypt-a-Glo™ Comprehensive Kit para comprobar el correcto funcionamiento de los reactivos que integran dicho kit. El control positivo está compuesto por una mezcla de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* y quistes de *Giardia lamblia* los cuales presentan una morfología diferente por lo que no dificultan la identificación de los ooquistes.

El procedimiento seguido es el propuesto por el fabricante del kit (15):

- Preparar solución de trabajo de DAPI 1X.
 - Añadir 1 µL de DAPI (código de producto: D101) a 5 mL de PBS (pH 7,4). Alternativamente añadir 10 µL de DAPI a 50 mL de PBS. Mezclar. Preparar solución de trabajo diariamente. Descartar cualquier solución 1X que no haya sido utilizada.
- La muestra debe fijarse al portaobjetos de la misma forma que para la tinción ZN.
- Cuando la muestra se encuentre completamente seca luego del agregado de metanol, debe realizarse la tinción con DAPI. Añadir 50 µL de solución de trabajo 1X a cada muestra y dejar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Eliminar el exceso de DAPI añadiendo 50-100 µL de buffer de lavado SureRinse, dejar por 1 minuto. Inclinar el portaobjeto para escurrir el exceso de buffer, puede utilizarse papel absorbente con la precaución de no alterar la zona de la muestra.
- Añadir una gota (aproximadamente 45 µL) del anticuerpo reactivo Crypt-a-Glo sobre la muestra seca. De ser necesario utilizar la punta de un tip para esparcir el reactivo por toda la zona de muestra cuidando no tocar la superficie del portaobjeto.

- Incubar portaobjeto en cámara húmeda a temperatura ambiente por 25 min. Puede colocarse en estufa de incubación a 37°C por 25 min.
- Enjuagar añadiendo 50-100 μ L de buffer de lavado SureRinse y dejar por 1 min. Inclinar el portaobjeto para escurrir el exceso de buffer, puede utilizarse papel absorbente con la precaución de no alterar la zona de la muestra.
- Agregar 1 gota de BlockOut. Incubar 1 min a temperatura ambiente.
- Enjuagar añadiendo 50-100 μ L de buffer de lavado SureRinse y dejar por 1 min. Inclinar el portaobjeto para escurrir el exceso de buffer, puede utilizarse papel absorbente con la precaución de no alterar la zona de la muestra.
- Para la adición de No-Fade mounting medium, el portaobjeto debe estar prácticamente seco. Añadir una gota y colocar el cubre objeto.
- Observar en microscopio de fluorescencia AXIO Lab A1. Primero observar en filtro Fs 09 HE a 470nm y de observarse ooquistes pasar a filtro DAPI a 365 nm.
- Tener la precaución de realizar la tinción en un ambiente lo más oscuro posible para evitar que la luz minimice la intensidad del fluorocromo.

Al realizar la tinción se observan los ooquistes teñidos de color verde manzana flúor bajo el filtro para FITC con la morfología característica de *Cryptosporidium parvum* y en la observación con el filtro para DAPI se comprueba su viabilidad tras la visualización del ADN de los esporozoitos teñidos de color azul-celeste flúor, comprobándose así el correcto funcionamiento de los reactivos.



6.4. Aplicación de metodologías en matrices de estudio

Luego de comprobar que la tinción por inmunofluorescencia directa funcionara correctamente y establecer el procedimiento y reactivos correctos para la tinción Ziehl Neelsen, se prosiguió a probar la aplicabilidad de las metodologías en muestras de lechugas comerciales y agua de grifo.

Tras una revisión bibliográfica se encontraron dos formas similares de concentrar y recuperar los ooquistes desde una muestra de lechuga por medio de centrifugación, para la aplicación de las tinciones, las cuales están presentes en los. (9) y (16). Con la base de ambos se estableció el siguiente procedimiento de concentración de ooquistes para muestras de lechuga:

- a. Pesar 30g de muestra en bolsa con filtro, tomando hojas tanto del centro de la lechuga como de las externas. Utilizar pinza y tijeras estériles.
- b. Añadir 100 mL de agua destilada estéril
- c. En caso que corresponda, agregar inóculo para contaminar artificialmente la muestra.
- d. Homogeneizar la muestra en un stomacher por 2 min.

- e. Dejar reposar la muestra por 24hs a temperatura ambiente, para que los ooquistes sedimenten.
- f. Restirar las 9/10 partes del volumen total, y traspasar el sedimento a un tubo falcon de 15 mL
- g. Centrifugar a 3000rpm por 10 min.
- h. Retirar sobrenadante con la precaución de no alterar el pellet.
- i. Homogeneizar el pellet con vortex y realizar las tinciones correspondientes a partir de este.

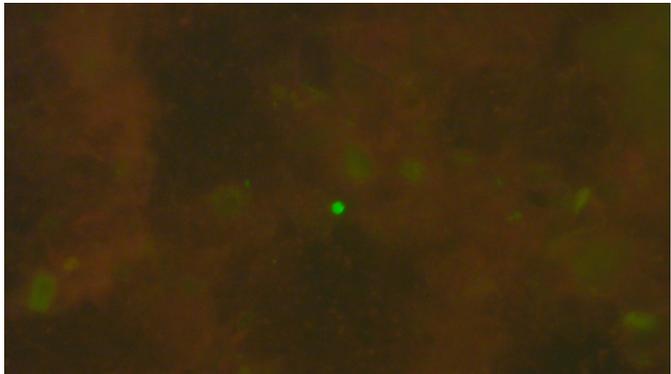
○ Prueba N°1:

Para inocular una lechuga comercial se preparó una suspensión de ooquistes de 10^2 oq/ μ L cuyo recuento arrojó los siguientes resultados:

Media (oq/ μL)	$6,5 \times 10^2$
Desviación estándar	57,9151678
RSD (%)	8,8 (<16%)

Se prosiguió inoculando 30 g de dos lechugas, L1 con 1 μ L de suspensión y L2 con 10 μ L, de modo de poder observar la recuperación del método de concentración a distintas cantidades de ooquistes. A cada pellet de muestra se le aplicó ambas tinciones:

MUESTRA	TÉCNICA	RESULTADO
L1	ZN	El centro del fijo quedó muy oscuro y no se pudo visualizar. En los bordes se observa una posible presencia de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> .
	IFD	No se encontraron ooquistes, la tinción se observa como una masa densa que interfiere la posible

		visualización de ooquistes.
L2	ZN	La tinción quedo muy oscura impidiendo la observación.
	IFD 	Se detecto un solo posible ooquiste, pero al pasar al filtro de DAPI no se visualizo la presencia del ADN de los esporozoitos internos para determinar la viabilidad del ooquiste, por lo que no se considera un resultado valido.

Observación: A pesar de haber utilizado una alta concentración de ooquistes como inculo, no se detectó la presencia de ooquistes al observar las muestras tras las tinciones. Sólo en la tinción por IFD del pellet L2 se detectó un posible ooquiste el cual no pudo ser confirmado ya que no se observó el ADN de los esporozoitos bajo el filtro para DAPI. A su vez se observa que la matriz de lechuga para la tinción por inmunofluorescencia presenta muchas interferencias dificultando la visualización de los ooquistes que se encuentren presentes.

Conclusión: Tras estos resultados se plantea la posibilidad que los ooquistes no sedimenten completamente como es lo propuesto en el procedimiento y que al extraer las 9/10 partes del sobrenadante se arrastren, por lo que se replantea el procedimiento descartando la etapa de sedimentación y extracción del sobrenadante, procesando así todo el volumen añadido.

Por lo tanto el procedimiento se modifica a partir del punto e:

- e. Una vez homogeneizada la muestra, retirar la totalidad del volumen agregado distribuyéndolo en 2 tubos falcon de 50 mL. Al eliminar la etapa de sedimentación de 24 hs el método se reduce a un día de ensayo.
- f. Centrifugar los tubos a 9000g por 15 min y a 4°C.
- g. Retirar sobrenadante de los tubos dejando el mínimo volumen necesario para homogeneizar el pellet.

- h. Traspasar el pellet a un tubo eppendorf. En caso de observar que el pellet queda muy espeso se pueden agregar, aproximadamente, 500µL de PBS.
- i. Centrifugar a 3000rpm por 10 min.
- j. Retirar sobrenadante, homogeneizar pellet y realizar las tinciones correspondientes.

- Prueba N°2

La segunda prueba que se realizó consistió en la inoculación de dos lechugas para comprobar si el método de retención de *Cryptosporidium* sobre membrana y extracción de ADN para muestras de agua con el que se contaba era eficaz para las muestras de lechuga.

El procedimiento de retención por filtración y extracción de ADN es el siguiente:

- a. Filtrar los 100 mL de agua añadida a la muestra, previamente homogeneizada, a través de una membrana de esteres de celulosa de 1.2 µm de tamaño de poro y 47mm de diámetro montada en un embudo de filtración estéril aplicando vacío.
- b. Transferir la membrana a un tubo falcon estéril de 50 mL y agregar 1 mL de buffer de lisis estéril precalentado a 70 ° C. Incubar en baño de etanol y hielo seco, completando 3 ciclos de congelado-descongelado procurando y manteniendo el pasaje de líquido sobre la membrana.
- c. Completada la etapa 2, transferir la totalidad del volumen a un tubo eppendorf y agregar Lisozima a una concentración final de aproximadamente 100µg/mL e incubar durante 30 min a 70° C.
- d. Agregar Proteinasa K y RNasa A a una concentración final de 100µg/mL y 50µg/ml respectivamente e incubar durante otros 30 min a 70° C.
- e. Agregar 1 ml de etanol absoluto. Mezclar por agitación.
- f. Transferir 700 µl de la solución anterior a columna QIAGEN
- g. Centrifugar a 9.5 rpm durante 1 minuto. Eliminar el flow-through. (Repetir esta etapa en caso de que el volumen inicial sea superior a los 700µl).
- h. Agregar 700 µl de buffer AW1 y centrifugar a 9.5 rpm por 1 min. Eliminar flow-through.

- i. Agregar 500 μl de buffer AW2 y centrifugar a 13.4 rpm (máxima velocidad) durante 2 minutos. Eliminar flow-through. Agregar otros 500 μl de buffer AW2 y centrifugar a 13.4 rpm por 2 min. Eliminar flow-through.
- j. Centrifugar a 13.4 rpm por 1 minuto para eliminar el exceso de líquido de la columna.
- k. Transferir las columnas a tubos eppendorf y agregar 100 μl de buffer AE precalentado a 70°C.
- l. Mantener 1 minuto y centrifugar a 13.4 rpm por 1 minuto.
- m. Rotular adecuadamente los tubos eppendorf y guardar en freezer a -20° C.

Para la realización de esta segunda prueba, se volvieron a inocular dos lechugas (L3 y L4), para lo que se utilizó la suspensión preparada anteriormente de 10^2 oq/ μL . Previo a su uso, como llevaba más de 24 hs de preparada y enumerada, se volvió a realizar el recuento de las 6 alícuotas para confirmar que la concentración de ooquistes se mantuviera estable.

Media (oq/ μL)	5,7 x10²
Desviación estándar	54,7722558
RSD (%)	9,5 (<16%)

Como la cantidad de ooquistes/ μL se mantuvo dentro del orden inicial, se prosiguió inoculando con 1 μL (aprox. 570oq/ μL) a la muestra L3 y con 10 μL (5700oq/ μL) a la L4. A su vez, al volumen restante de la suspensión (570 μL) se le extrajo el ADN para utilizarla como control positivo en el PCR.

Con la muestra L3 se aplicó el procedimiento de filtrado descrito anteriormente, comprobándose que por la matriz de la lechuga y la suciedad que esta trae, el filtro queda obstruido impidiendo el pasaje de la totalidad del volumen. A causa de esto, se pasó el filtro a un tubo falcon de 50 mL y se lavó la membrana con el volumen de muestra restante. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y se extrajo el sobrenadante. El pellet obtenido se re suspendió en 1 ml de buffer de lisis y se prosiguió con el procedimiento de extracción de ADN.

Al tener este inconveniente con la filtración, la muestra L4 se concentró mediante el procedimiento utilizado para las tinción ZN. Por lo cual se centrifugó todo el volumen de muestra, se retiró el sobrenadante y se re suspendió el pellet en 2 ml de PBS. Se volvió a centrifugar y a retirar el sobrenadante. Al pellet obtenido se le agregó 1 ml de buffer de lisis para la extracción de ADN.

Se cuantificó el ADN obtenido tras las extracciones a través del instrumento fluorométrico Qubit, obteniendo los siguientes resultados con un volumen de toma de 1 µl de muestra y de 20 µl para el control positivo:

Muestra	[vol. Toma]
L3	6.12ng/ µl
L4	6.28ng/ µl
C+	0.0393ng/ µl

Las extracciones obtenidas fueron guardadas a -20°C en espera de la llegada de los reactivos para el PCR.

Conclusiones: se establece que para la matriz de estudio la retención de ooquistes en membrana mediante filtración no es viable ya que por las impurezas y la composición misma de la lechuga el filtro se obstruye. Por lo cual se decide cambiar esa etapa por la concentración y recuperación de ooquistes mediante centrifugación. A su vez se comprueba el buen funcionamiento del proceso de extracción de ADN evidenciado por la cuantificación a través del instrumento Qubit.

○ Prueba N°3

Se preparó una nueva suspensión intermedia de ooquistes de concentración 10^3 oq/µL y una suspensión de trabajo de 10^2 oq/ µL. Los recuentos arrojaron los siguientes resultados:

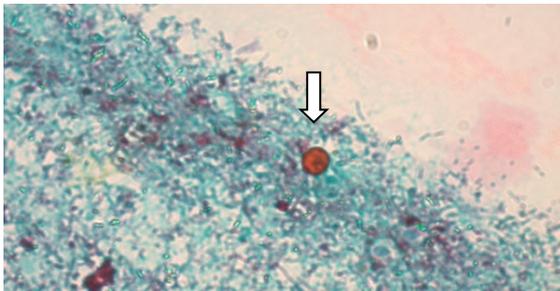
Media (oq/ µL)	$2,3 \times 10^3$	Media (oq/ µL)	$1,3 \times 10^2$
Desviación estándar	245,79802	Desviación estándar	18,8193163
RSD (%)	10,7(<16%)	RSD (%)	14,6(<16%)

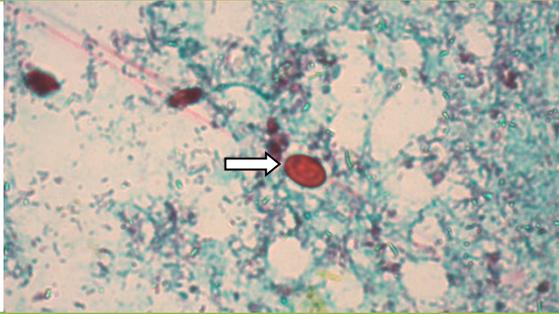
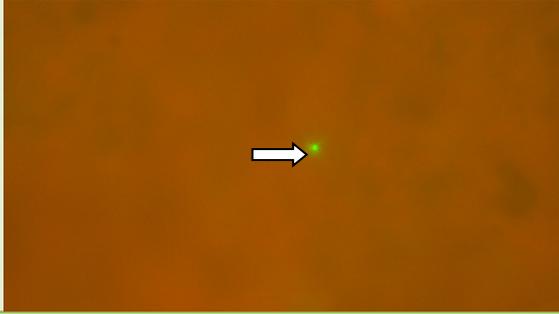
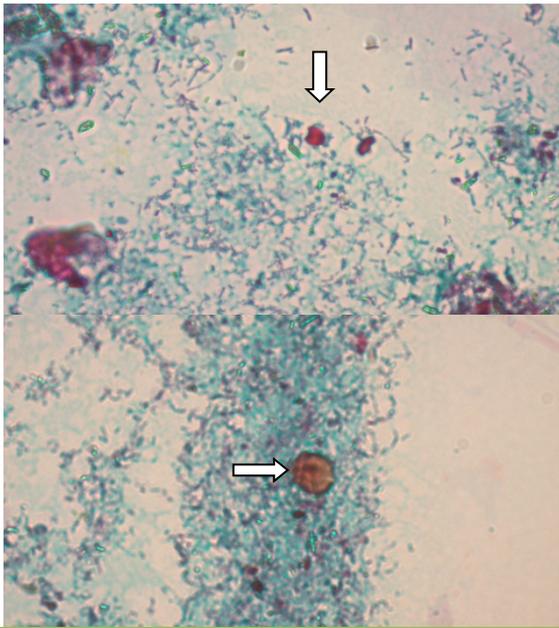
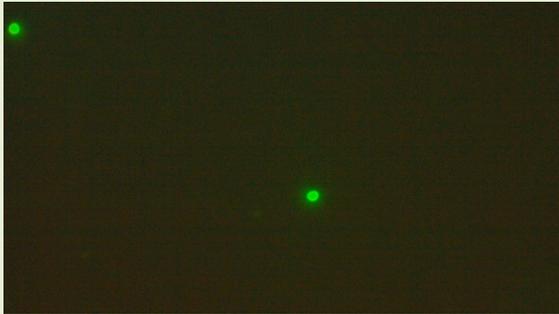
En esta tercera prueba se volvieron a inocular dos lechugas (L5 y L6) con el objetivo de comprobar si los cambios propuestos para el procedimiento de concentración y recuperación de ooquistes por centrifugación son efectivos. Al igual que en la prueba N°1, se les aplicará a cada muestra ambas tinciones. A su vez, se inoculó una muestra de 250mL de agua de grifo (A1) y se le aplicó la tinción por inmunofluorescencia con el fin de determinar si las dificultades de visualización presentes en la muestra de lechuga son causa de la matriz.

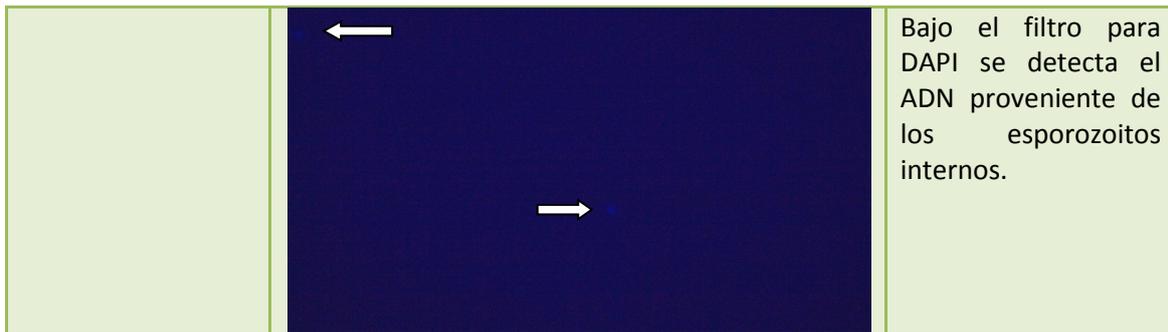
Procedimiento de concentración de ooquistes para muestras de agua:

- Filtrar 250 mL de muestra con membrana de 1.2 µm de poro y 47 mm de diámetro
- Pasar membrana a tubo falcon de 50 mL. Añadir 1 mL de PBS para enjuagar la membrana. Vortexear
- Retirar líquido y pasarlo a tubo eppendorf de 1,5mL.
- Centrifugar contenido del tubo a 3000 rpm por 10 min.
- Retirar sobrenadante
- Vortexear pellet.
- Volver a centrifugar a 3000 rpm por 10 min.
- Retirar sobrenadante dejando el menor volumen posible. Vortexear

La muestra L5 fue inoculada con 1 µL de la suspensión de trabajo, teniendo aproximadamente 100oq/µL, y la muestra L6 y A1 con 10 µL de dicha suspensión (1000oq/µL).

MUESTRA	TINCION	RESULTADO
L5	IFD	No se observaron ooquistes
	ZN 	Se observan ooquistes principalmente en los bordes del fijo.

		
L6	<p>IFD</p> 	<p>Se observa 1 ooquiste no confirmatorio con DAPI. Muy costosa la visualización por la presencia de una masa densa interferente teñida de color rojizo.</p>
	<p>ZN</p> 	<p>Se visualizan ooquistes</p>
A1	<p>IFD</p> 	<p>Se detectan ooquistes más fácilmente y sin la presencia de la masa densa de color rojizo que se visualiza en las tinciones a lechugas, la cual obstaculiza la observación de ooquistes.</p>



Conclusión: Se comprueba que con la tinción Ziehl Neelsen se logran ver claramente los ooquistes y que los cambios efectuados en el procedimiento de concentración fueron efectivos, por lo que se concluye la integración de ambas técnicas como un buen método inicial para la detección de *Cryptosporidium* en muestras de lechuga. En cambio la tinción por inmunofluorescencia sigue presentando las mismas dificultades para visualizar los posibles ooquistes presentes en muestras de lechuga a diferencia de la muestra de agua, por lo que se decide descartarla como método de detección para muestras de lechuga por efectos de la matriz y establecerlo como método para muestras de agua.

○ Prueba N°4

Con el fin de comprobar si el método de PCR seleccionado responde correctamente, se realizó esta cuarta prueba con los productos de extracción de ADN obtenidos de las muestras contaminadas artificialmente L3 y L4.

La información necesaria para la realización del PCR fue sacada de lo propuesto por (13)

Para la realización del mix de reactivos y muestra se siguió el siguiente procedimiento:

- Primer round
- Hidratar perlas puReTaq Ready-To-Go con 22µL de agua calidad molecular
 - Contenido de las perlas:
 - BSA,dATP,dCTP,dGTP,dTTP
 - 2.5 unidades de AND de puReTaq polimerasa y buffer de reacción
 - Reconstruidas en un volumen total de 25 µL la concentración de cada dNTP es de 200 µM en 10 mM Tris-HCl, 50mM KCl y 1,5mM MgCl₂
- Agregar 1 µL del primer BcowpF, 1 µL de BcowpR y 1 µL de ADN target

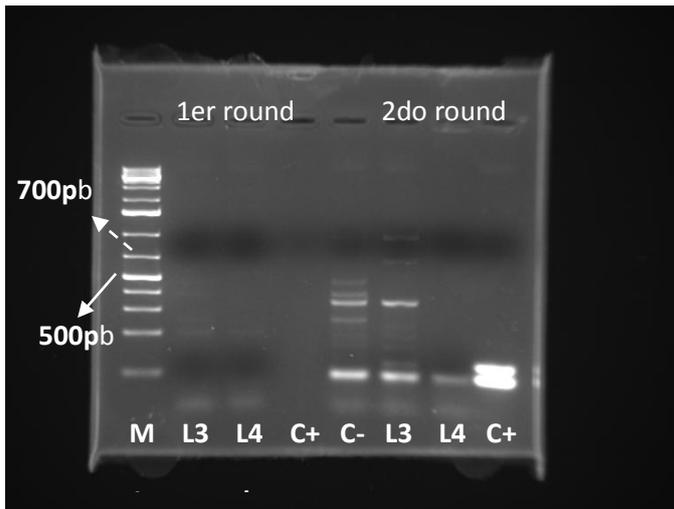
- Para el control negativo sustituir el ADN target por agua calidad molecular.
- Segundo round
- Hidratar nuevas perlas
- Agregar 1 μL del primer Cry-15, 1 μL Cry-9 y 1 μL de ADN target producto de amplificación del primer PCR
- Para el control negativo tomar 1 μL del mix del control negativo del primer PCR.

Perfil térmico para ambos rounds:

1. Incubación inicial a 95°C por 5 minutos
2. 35 ciclos de
 - a. 94°C durante 1 minuto
 - b. 55°C durante 1 minuto
 - c. 75°C durante 1 minuto
3. Extensión final a 72°C durante 10 minutos
4. Mantenimiento de las reacciones a 4°C

Procedimiento para el revelado de los productos de amplificación por electroforesis:

- Preparación de gel de agarosa al 2%
 - Agregar al gel en estado líquido 10 μL de Gel-red cada 100 μL de gel de agarosa
- Colocar en cubeta con el peine para formar los posillos para agregar las muestras y dejar solidificar
- Agregar buffer TAE 1X y retirar peine
- Mezclar sobre papel parafilm 5 μL del producto de PCR con 1 μL de Loading buffer
- Cargar los posillos con los 6 μL de mezcla
- Conectar la cubeta a la fuente de corriente eléctrica. El terminal negativo debe arriba (altura de las muestras) y el positivo abajo, para que el ADN corra hacia abajo por el gel.
- Aplicar 100 V durante 45 minutos
- Transcurrido el tiempo retirar el gel de la cubeta
- Revelarlo bajo una fuente de luz UV.
- Resultado del PCR anidado ensayado sobre L3 y L4



Muestra	1er round	2do round
L3	-	-
L4	-	-
C-	+	-
C+	-	

Conclusiones: A causa de una mala preparación del control negativo se observa que el mismo da positivo. Como la cubeta utilizada era pequeña para la cantidad de muestras, y como se estaba al tanto que el control negativo daría mal, no se colocó el C- producto del segundo round. El C+ tampoco da el resultado esperado por lo que el resultado de las muestras de este PCR no se toman como válidos.

○ Prueba N°5

Se prosiguió a preparar suspensiones de ooquistes de trabajo de concentración $1,6 \times 10^2$ oq/ μ L y 25 oq/ μ L para contaminar artificialmente nuevas muestras comerciales de lechuga y agua de grifo.

Resultado de recuento de suspensiones:

Media (oq/ μL)	$1,6 \times 10^2$
Desviación estándar	20,9165007
RSD (%)	13 (<16%)

Media (oq/ μL)	25
Desviación estándar	0
RSD (%)	0 (<16%)

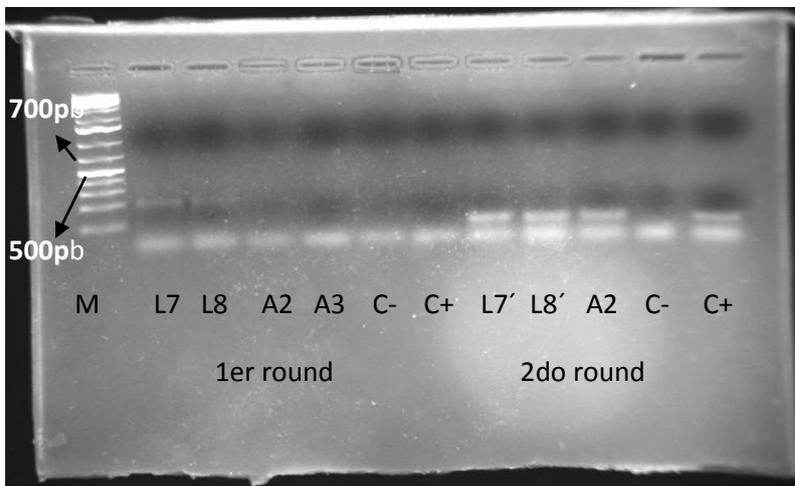
El inóculo propuesto fue el siguiente:

- L7 con 25 oq/ μ L (1 μ L susp. de 25 oq/ μ L)
- L8 con 160 oq/ μ L (1 μ L susp. de $1,6 \times 10^2$ oq/ μ L)
- A2 con 25 oq/ μ L
- A3 con 160 oq/ μ L

Se extrajo el ADN de todas las muestras según los procedimientos propuestos y el resultado de la cuantificación con el instrumento Qubit fueron los siguientes:

Muestra	[vol. Toma] (ng/μL)
C+	0.0393
A2	0.0241
A3	0.0578
L7'	4.022
L8'	3.44

- Resultado PCR anidado



Muestra	1er round	2do round
L7	-	-
L8	-	-
A2	-	-
A3	-	-
C+	-	-
C-	-	-

Observación: Se observan bandas levemente marcadas en el primer round de L7 y L8 pero no caen dentro del producto de amplificación de *Cryptosporidium* para el primer round (790pb). El control negativo dio el resultado esperado, en cambio en el control positivo (que fue el mismo que se utilizó para la prueba N°4) no presenta amplificación. Se atribuye como posible fuente de error, que en la etapa de

extracción de ADN, no se extrajo el etanol agregado para precipitar el ADN ni se paso por la columna QIAGEN para su purificación, a causa de un error de concepto, por lo cual el proceso de extracción no fue realizado correctamente. Dicha falla fue descubierta luego de analizar los resultados obtenidos, por esto no se tuvo en cuenta la preparación de un nuevo control positivo previo a la realización de esta prueba.

Conclusión: No se consideran validos los resultados obtenidos de las muestras contaminadas artificialmente, ya que no se pudo comprobar el correcto funcionamiento del proceso de PCR por la falla del control positivo.

Como los reactivos para esta metodología eran limitados y costosos, no se realizó una siguiente prueba para verificar su funcionamiento. Se decidió aplicar de todos modos esta metodología de detección a las muestras de estudio, luego de realizar la tinción ZN, a modo de comparación de resultados.

}

Sección VII: Validación

Tras establecer como método de detección para las muestras de lechuga la concentración de ooquistes por centrifugación y posterior tinción mediante la técnica Ziehl Neelsen modificada, y para las muestras de agua la concentración de ooquistes por filtración y posterior tinción por inmunofluorescencia directa, se prosiguió planificando la validación para ambas metodologías.

Por decisión de las partes interesadas no se realizó la validación para el método de PCR.

7.1. Plan de validación, matriz: Lechuga

Alcance de la validación

- Método: Recuperación por centrifugación y tinción Ziehl Neelsen modificado.
- Analito: Ooquistes de *Cryptosporidium* spp
- Matriz: Lechuga
- Tipo de método: Cualitativo
- Parámetro a evaluar: Límite de detección.

Diseño experimental

Se preparan dos suspensiones de ooquistes de trabajo, cuyo recuento arroja los siguientes resultados:

Media (oq/ μL)	6,2	Media (oq/ μL)	25
Desviación estándar	0	Desviación estándar	0
RSD (%)	0 (<16%)	RSD (%)	0 (<16%)

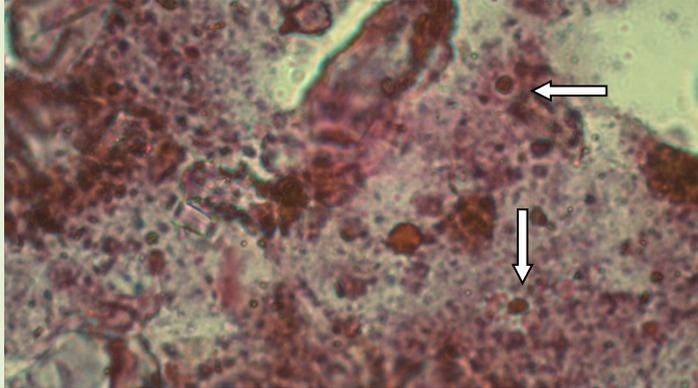
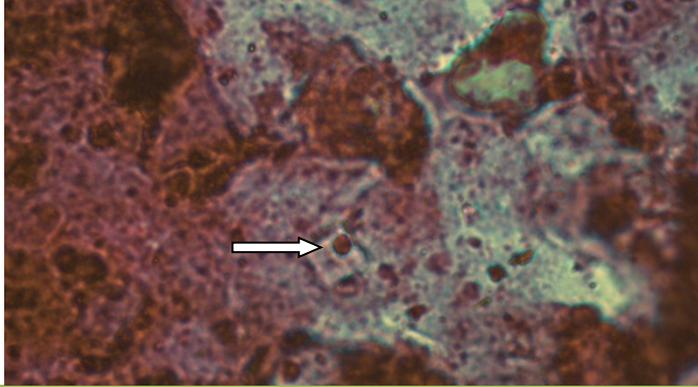
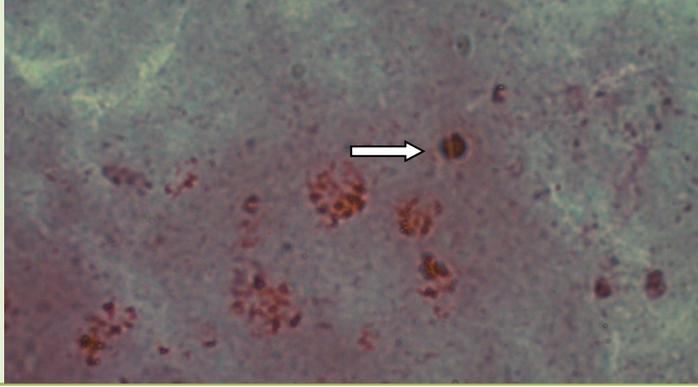
Con estas suspensiones de 25oq/ μ L y 6oq/ μ L (según recuento), se realiza contaminación artificial de 4 lechugas con los siguientes inoculos:

- LV1 con 75 oq/ μ L (3 μ L de susp. de 25 oq/ μ L)
- LV2 con 50 oq/ μ L (2 μ L susp. de 25oq/ μ L)
- LV3 con 25 oq/ μ L (1 μ L susp. de 25oq/ μ L)
- LV4 con 6 oq/ μ L (1 μ L susp. 6oq/ μ L)

De esta forma se determinará la mínima concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* spp detectable por el método propuesto.

7.1.1. Informe de validación

Resultados obtenidos

Muestra	Observación
LV1	
LV2	
LV3	
LV4	No hubo detección

Conclusión

Hubo detección de ooquistes en todas las muestras contaminadas artificialmente en excepción de LV4, la muestra con el inóculo más bajo, por lo que se define según las concentraciones establecidas, que el límite de detección para la metodología propuesta es de 25 oq/ μL .

Teniendo en cuenta la baja dosis infectiva de *Cryptosporidium*, el método debería poder detectar la presencia de ooquistes en cantidades reducidas, por lo que sería recomendable, en etapas futuras, lograr disminuir el límite de detección a por lo menos 10 oq/ μL .

7.2. Plan de validación, matriz: Agua

Alcance de la validación

- Método: Recuperación por filtración y tinción por inmunofluorescencia directa.
- Analito: Ooquistes de *Cryptosporidium parvum*
- Matriz: Agua
- Tipo de método: Cualitativo
- Parámetro a evaluar: Límite de detección.

Diseño experimental

En este caso, se utiliza como fuente de inóculo la suspensión de control positivo del kit Crypt-a-Glo, partiendo de la concentración informada por el fabricante de $2,0 \times 10^5$ oq/mL (200 oq/ μL) para realizar las diluciones de trabajo.

Se realiza el recuento en cámara de Neubauer de las suspensiones y se obtienen los siguientes resultados:

Susp. Intermedia

Media (oq/ μL)	88
Desviación estándar	7,52772653
RSD (%)	8,5 (<16%)

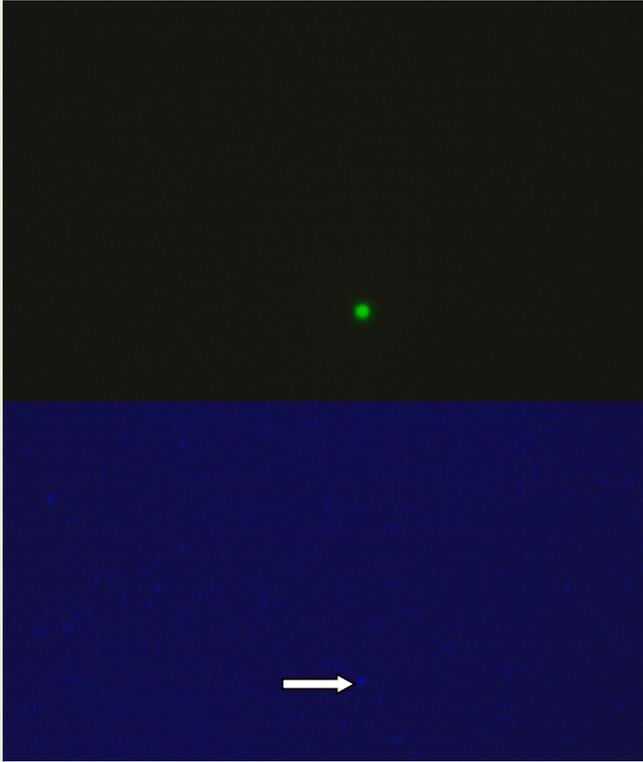
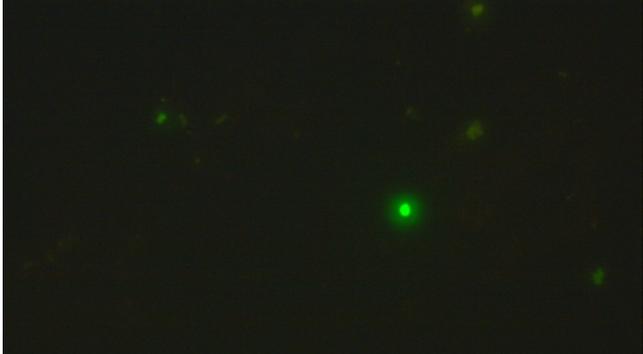
Susp. de trabajo

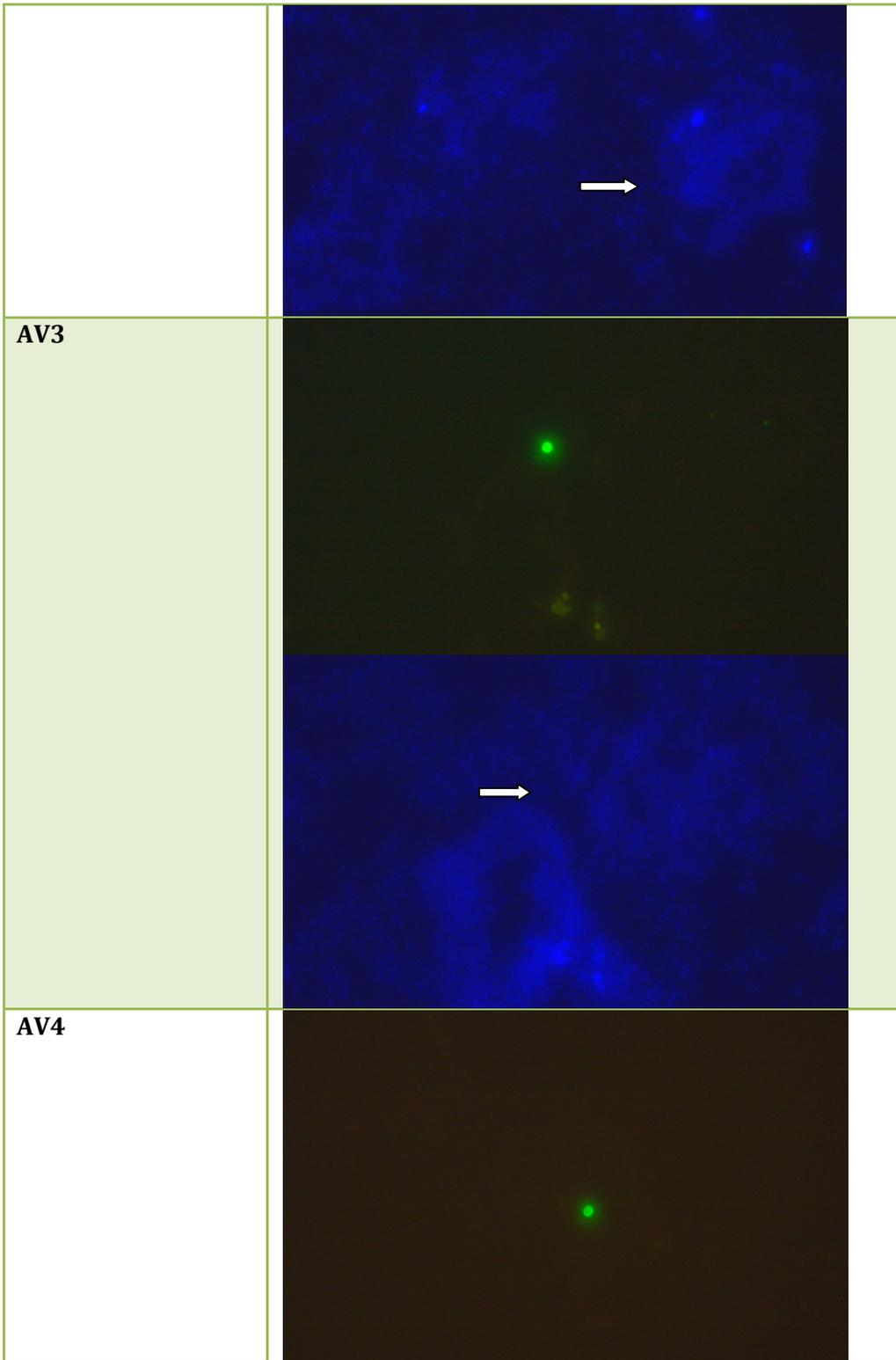
Media (oq/ μL)	25
Desviación estándar	0
RSD (%)	0 (<16%)

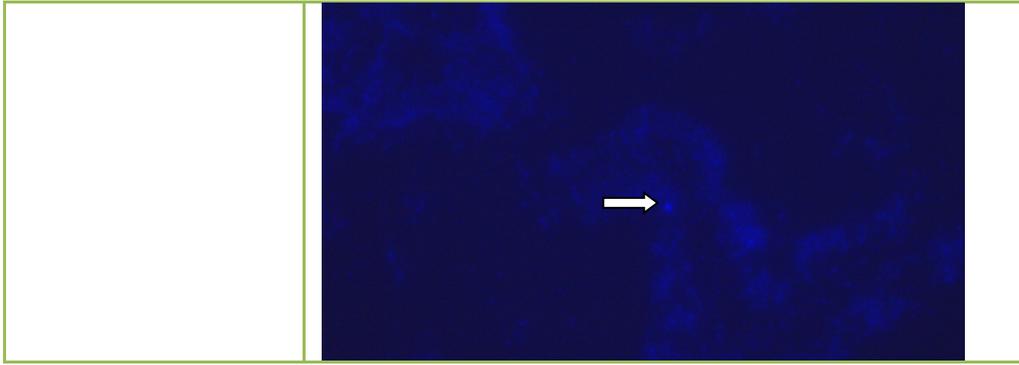
A partir de una dilución de 25oq/ μL (según recuento) se contaminan artificialmente 4 muestras de 250 mL agua de grifo con los siguientes inóculos:

- AV1 con 25 oq/ μL (1 μL de susp.)
- AV2 con 50 oq/ μL (2 μL de susp.)
- AV3 con 75 oq/ μL (3 μL de susp.)
- AV4 con 100 oq/ μL (4 μL de susp.)

7.2.1. Informe de validación

Muestra	Observación
AV1	
AV2	





Conclusión: Se observó presencia de ooquistes en todas las muestras contaminadas artificialmente, por lo que se establece para la metodología de recuperación de ooquistes por filtración y posterior tinción por inmunofluorescencia directa, un límite de detección de 25 oq/ μ L.

Al igual que lo concluido en la validación anterior, es recomendable intentar disminuir este límite de detección, ya que la dosis infectiva es menor a los ooquistes detectables.

Sección VIII: Muestreo

De los seis posibles establecimientos marcados en el mapa adjunto en el plan de actividades, se realizó el muestreo en el punto 1 y 6. Ya que se presentaron algunos contratiempos al momento de optimizar las metodologías, el tiempo disponible para la realización de la pasantía no fue suficiente para muestrear un tercer establecimiento como fue marcado inicialmente.

En el siguiente cuadro se presenta información de interés sobre los establecimientos muestreados:

Punto	Sistema de riego	Procedencia del agua	Higiene global	Otras características	Fertilizantes utilizados
1	Goteo	Pozo cañada cercana	y Regular	Cultivo durante todo el año. Invernáculo. Poca cantidad	Abono de bosta de pollos
6	Aspersión	Agua lluvia polder	de y Normal	Cultivo durante todo el año. Al aire libre. Gran	Abono de bosta de pollos, abono

cantidad

orgánico
verde y
15-15-15

Se denominó al punto 1 como establecimiento N°1 y al punto 6 como establecimiento N°2.

Se muestrearon 12 lechugas 12L de agua de riego. Las muestras de lechuga colocadas en bolsas individuales y el agua se recolectó en bidones de 6L. Ambas fueron refrigeradas en cámara de frío a 4°C hasta su procesamiento.

8.1. Muestreo establecimiento N°1.

Ubicado entre Cerrillos y Aguas Corrientes, Canelones.

En el lugar se evidencia la presencia de una vaca, un caballo, un cerdo y varios perros, los cuales se consideran una posible fuente de contaminación fecal.

El agua de riego era proveniente de un pozo profundo del cual los propietarios del lugar utilizaban ocasionalmente para beber.

Imágenes de la zona de muestreo



8.2. Muestreo establecimiento N°2

Ubicado en camino O'Higgins, Montevideo. Establecimiento de mayor tamaño que el primero, el cual se distribuye a ambos lados de la calle. En el campo lindero de la parte trasera de la vivienda y galpones, hay un criadero de pollos, el cual los provee de abono de bosta. Las plantaciones de lechuga de donde se extrajeron las muestras se encuentran del lado de en frente de la cuadra, donde no se evidenció presencia de animales.

Utilizan un sistema de riego llamado polder, con el cual recolectan el agua de lluvia y la envían a una especie de laguna artificial de donde bombean el agua por cañerías hasta las plantaciones para aplicar riego por aspersión.

Imágenes de la zona de muestreo



Sección IX: Procesamiento de muestras

9.1. Muestras del establecimiento N°1

Como las muestras fueron compartidas, la realización del muestreo en este establecimiento fue de las primeras actividades que se realizó al comenzar la pasantía, por lo que el tiempo que las muestras estuvieron almacenadas en refrigeración sin procesarse fue mayor al debido por no tener para ese entonces puesta a punto las metodologías. Esto llevó a que en el momento de procesar las muestras, 3 de ellas no se encontraran en condiciones aptas para su ensayo, por lo que se analizó un total de 9 muestras del primer establecimiento.

9.1.1. Ensayo de las muestras

- Recuento por NMP

Para el recuento de microorganismos indicadores, se siguió el procedimiento empleado por el laboratorio de microbiología del LATU.

Las diluciones realizadas fueron 1, -1 y -2 sembrando 10, 1 y 0,1 mL de muestra respectivamente en tubos con CLT. Se incubó los tubos por 48 hs a 35°C. Los que presentaron producción de gas fueron repicados a tubos con CBVB y EC para la confirmación de coliformes totales y fecales, incubando a 35°C y a 44,5°C por 48 hs, respectivamente. Fue aplicado solamente a las muestras de lechuga.

- Extracción de ADN y PCR anidado

Para llevar a cabo el control del PCR, se prepararon dos controles positivos nuevos, partiendo de la suspensión stock de ooquistes congelados y de la suspensión de ooquistes del control positivo del kit para inmunofluorescencia.

- Tinción por IFD

Se le aplicó la tinción por inmunofluorescencia directa a 250 mL de muestra de agua de riego de cada uno de los bidones muestreados.

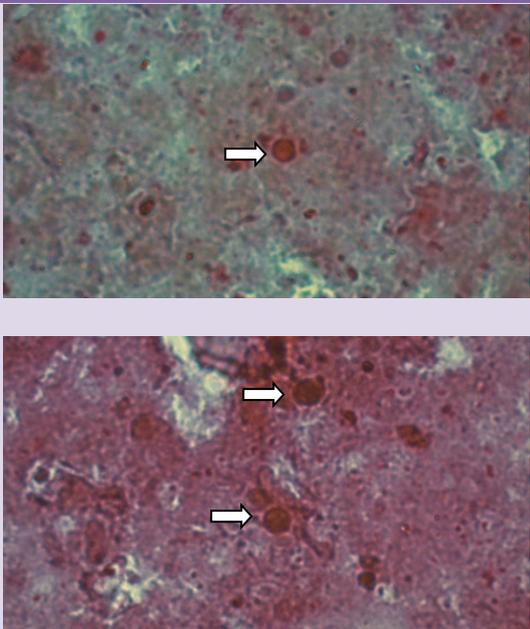
9.1.2. Resultados obtenidos

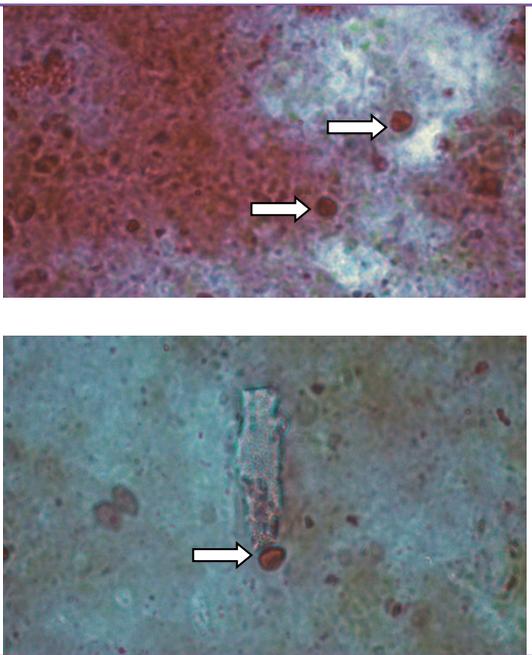
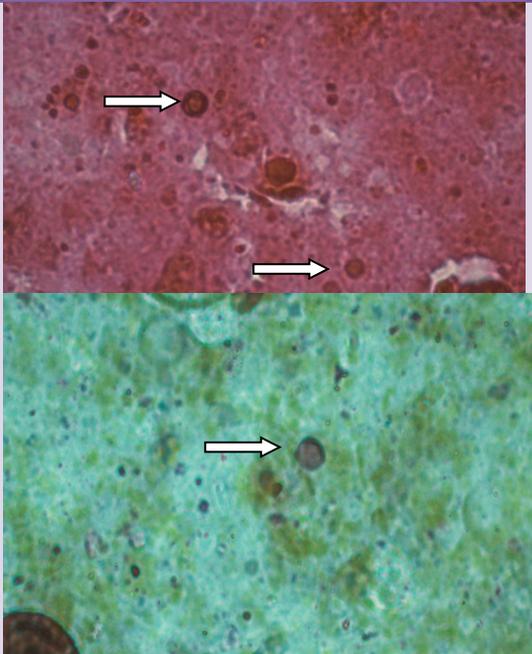
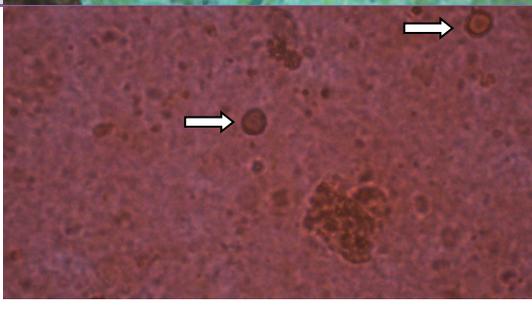
- Recuento de microorganismos indicadores por NMP

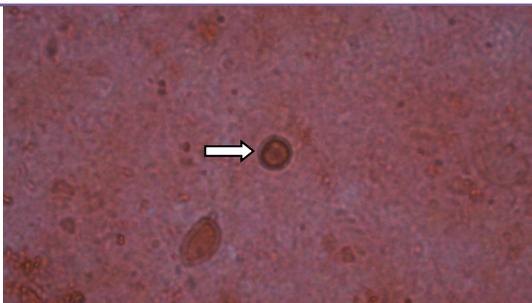
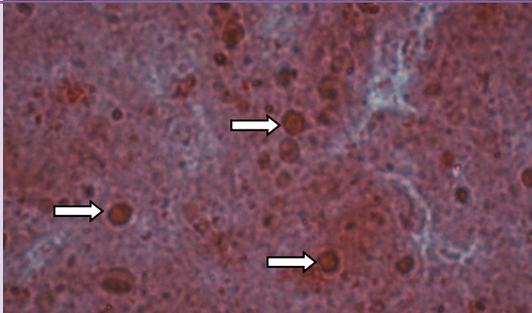
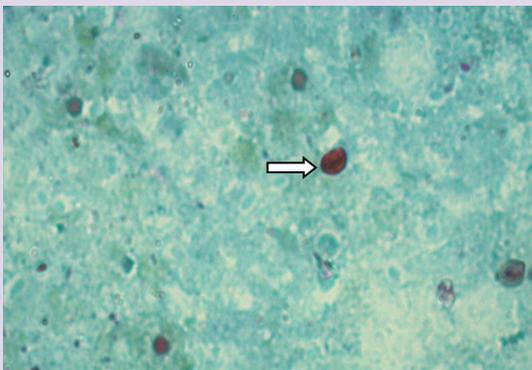
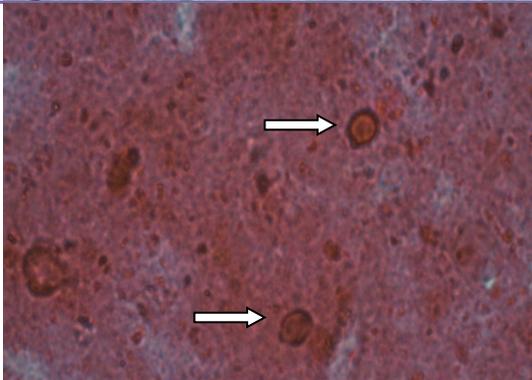
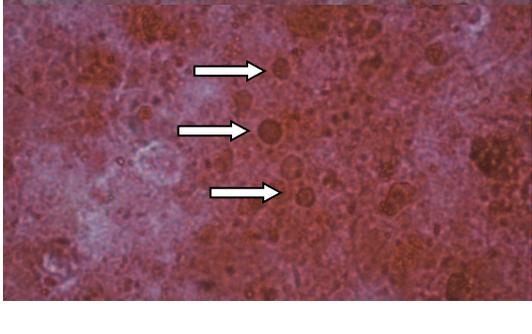
Indicadores microbiológicos	Muestra								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Coliformes totales (NMP/g)	<0,3	<0,3	1,1E+2	<0,3	2,3	2,3	<0,3	9,3	0,9
Coliformes fecales (NMP/g)	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	0,4	<0,3
Escherichia coli (NMP/g)	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	0,4	<0,3

Conclusión: las muestras no presentan una cantidad significativa de coliformes fecales, por lo que se puede suponer que no estuvieron expuestas a contaminación fecal.

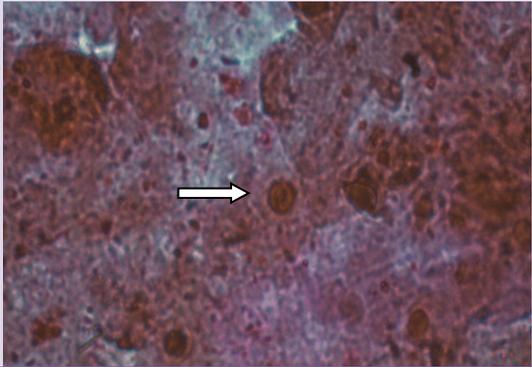
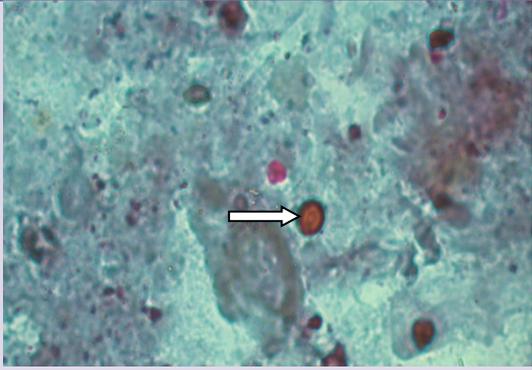
- Resultados de tinción Ziehl Neelsen

Muestra	Foto
L1,1	

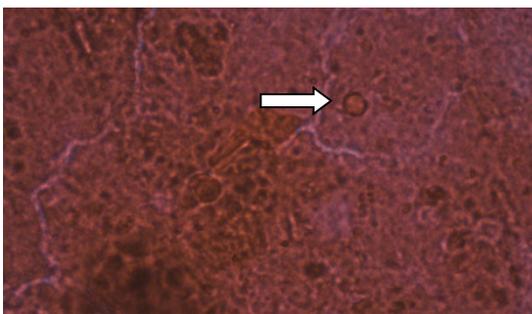
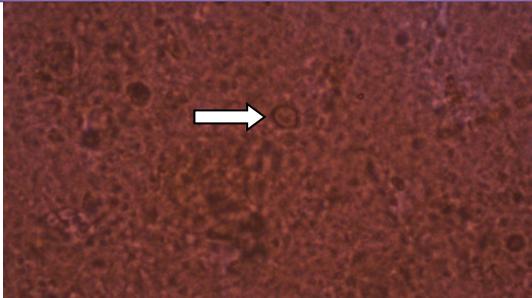
<p>L1,2</p>	
<p>L1,3</p>	
<p>L1,4</p>	

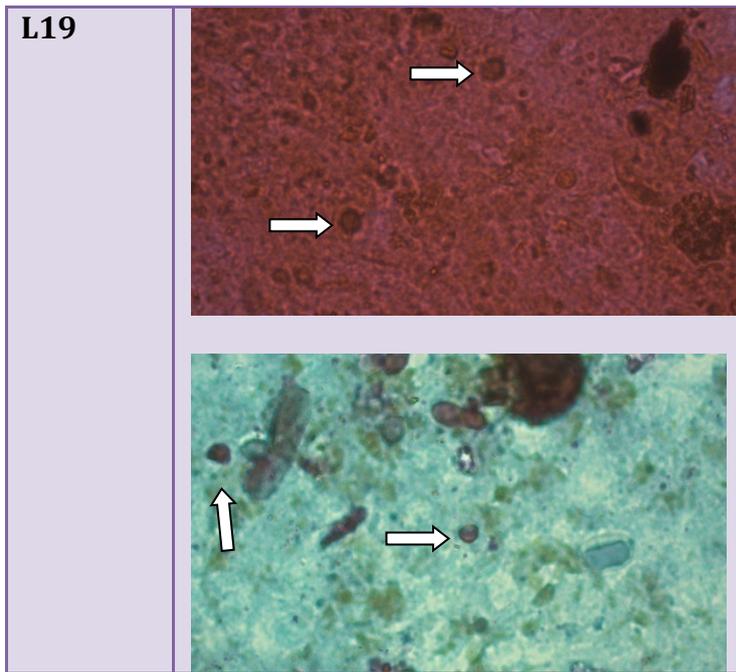
	
L1,5	 
L1,6	 

L1,7



L1,8





Observación: en las 9 muestras de lechuga procesadas se detectan estructuras esféricas de doble pared externa, de similar tamaño al de los ooquistes buscados, teñidas de color rojo-bordo oscuro. Dichas características parecen coincidir con las de los ooquistes de *Cryptosporidium*. Cabe destacar que se observó una gran cantidad de ooquistes por muestra.

Conclusión: Se determina la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en la totalidad de las muestras analizadas mediante la aplicación de la tinción Ziehl Neelsen. Estos resultados serán comparados con los arrojados por el PCR con el fin de observar la concordancia de ambos métodos.

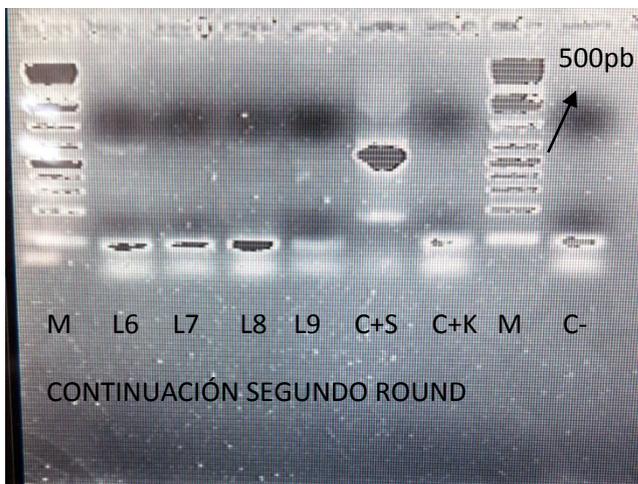
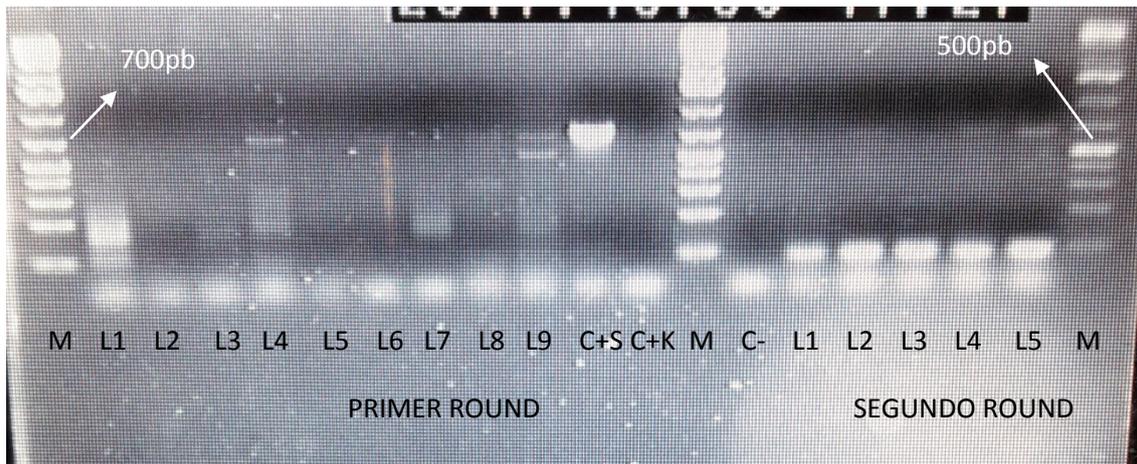
- Resultado del PCR anidado

Resultado cuantificación de ADN con instrumento Qubit (vol. Toma= 5 µl):

MUESTRA	[vol. Toma] (ng/ µl)	[Tubo] (ng/ mL)
L1,1	7.28	182
L1,2	8.32	208
L1,3	7.80	195
L1,4	9.80	245
L1,6	12.4	311
L1,7	1.92	47,9

L1,10	4.80	120
L1,11	18.60	464
L1,12	16.8	421
C+ susp	0.0884	2,21
C+ kit	0.290	7,26

Resultado del revelado de los productos de amplificación por electroforesis:



Muestra	1er round	2do round
L1,1	+	-
L1,2	-	+
L1,3	-	-
L1,4	+	+
L1,5	-	+
L1,6	+	+
L1,7	-	+
L1,8	+	+
L1,9	+	+
C+ susp	+	+
C+ kit	-	-
C-	-	-

Observación: A pesar de no haber obtenido un resultado positivo del PCR en las pruebas realizadas anteriormente, al aplicarlo a las muestras de estudio se observa una correcta respuesta de los controles, en excepción el control positivo proveniente del kit de inmunofluorescencia, el cual no presento amplificación.

Tanto las muestras como el control positivo proveniente de la suspensión de ooquistes congelada, muestran un producto de amplificación correcto para *Cryptosporidium* (790pb en el primero round y 550 pb en el segundo round). Las muestras que no amplificaron en el primer round pero si en el segundo, demuestran el aumento de la sensibilidad propuesto por el método.

Conclusión: el 77% de las muestras analizadas del establecimiento N°1 por PCR dieron positivo a la presencia de *Cryptosporidium*.

- Resultado de las muestras de agua de riego por IFD

Muestra	Resultado
A1,1	No se detectaron ooquistes de <i>Cryptosporidium parvum</i> .
A1,2	Idem

Conclusión: En los 250 mL de muestra de agua de riego de cada biodón, no se detectan ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, por lo que no se puede plantear como una posible fuente de contaminación.

9.2. Muestras establecimiento N°2

Las 12 muestras fueron procesadas hasta la obtención de las muestras de trabajo, al día siguiente de haber realizado el muestreo.

9.2.1. Ensayo de las muestras

- Recuento por NMP

Las diluciones utilizadas fueron las mismas que las usadas para las muestras del establecimiento N°1.

- Tinción por inmunofluorescencia directa de las muestras de agua de riego

De los 2 bidones de agua de riego muestreados, se procesaron 250 mL por duplicado de cada uno (el duplicado correspondió a la obtención de una muestra de trabajo para el ensayo de la tinción IFD y otra para la extracción de ADN), volumen para el cual se realizó la validación, además de ser el que se pudo filtrar antes de que la membrana se tapara por los sólidos suspendidos presentes en la muestra.

- Extracción de ADN

Junto con las muestras de lechuga, se extrajo el ADN de las muestras de agua de riego de ambos establecimientos, identificadas como A1,1 ; A1,2 ; A2,1 y A2,2.

- PCR anidado

Se utilizó el mismo control positivo que para el PCR de las muestras del establecimiento N°1 (C+s).

9.2.2. Resultados obtenidos

- Recuento de microorganismos indicadores por NMP

Indicadores microbiológicos	Muestra											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Coliformes totales (NMP/g)	2,4E+02	2,4E+02	4,6E+2	4,6E+02	4,6E+02	2,4E+02	2,4E+02	93	1,1E+02	93	93	4,6E+02
Coliformes fecales (NMP/g)	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
Escherichia coli (NMP/g)	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3

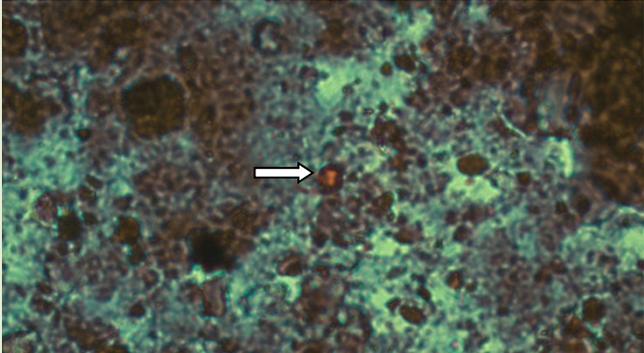
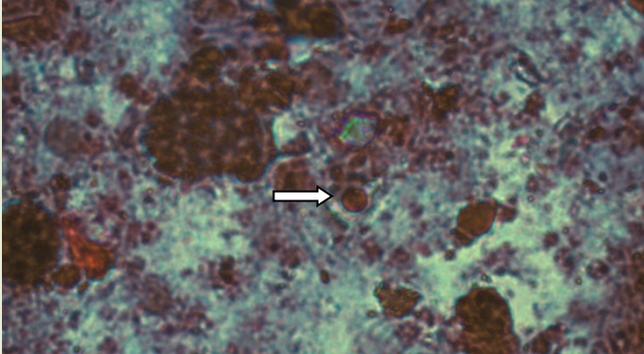
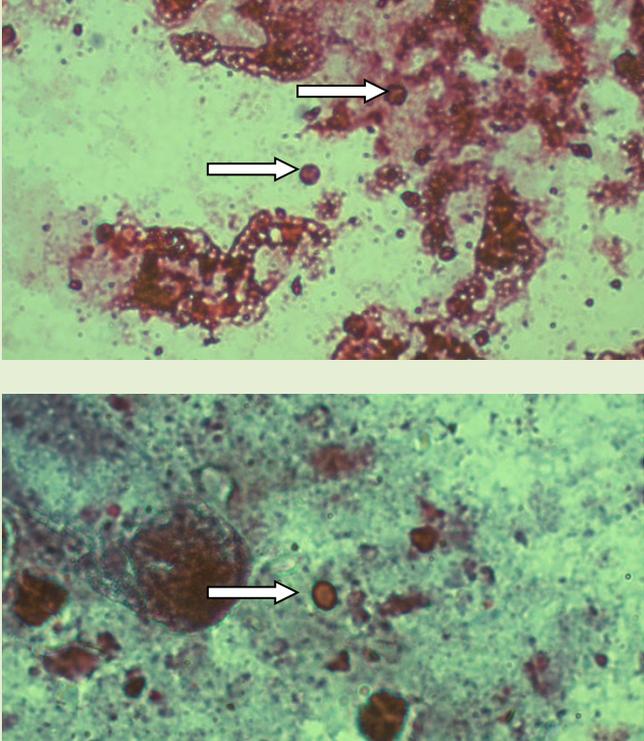
Conclusión: las muestras no presentan un recuento demasiado significativo de coliformes totales, aun así se encuentran en mayor cantidad que en las muestras del establecimiento N°1. El bajo recuento de coliformes fecales permite suponer que las muestras no estuvieron en contacto con fuentes de contaminación fecal, por lo que se podría eliminar la posibilidad de adquirir ooquistes de *Cryptosporidium* por este medio.

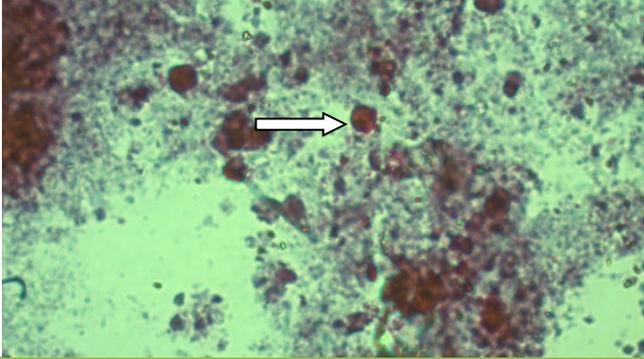
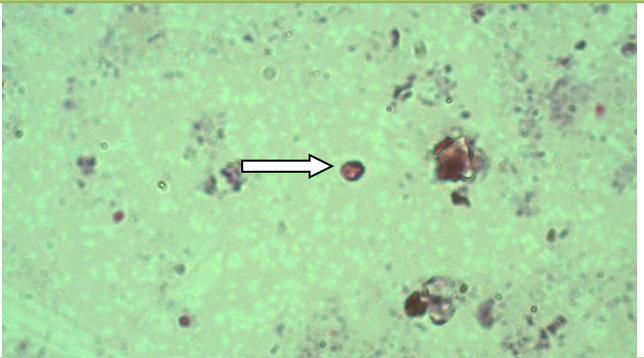
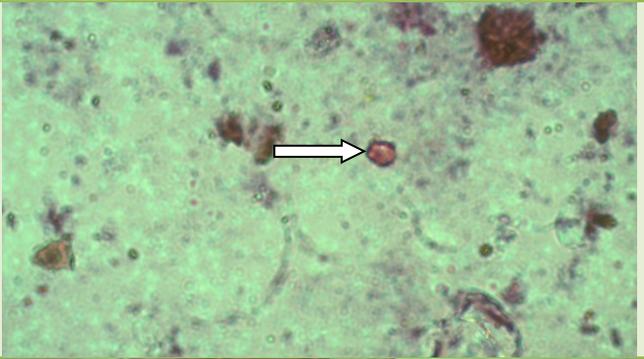
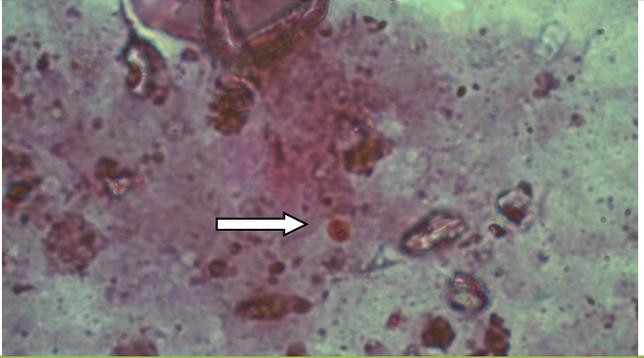
- Tinción IFD en muestras de agua de riego

Muestra	Resultado
A2,1	No se encuentran ooquistes de <i>Cryptosporidium parvum</i>
A2,2	Idem

Conclusión: No se detectan ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en los 250 mL de muestra analizados, descartando el agua de riego como un posible factor de contaminación.

○ Resultados de tinción Ziehl Neelsen

Muestra	Foto	Observación
L2,1		Se observaron muy pocas estructuras similares a los ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> , ninguna de ellas lo suficientemente confirmatorias.
L2,2		No se encuentran ooquistes
L2,3		Se ve solo una estructura similar, no confirmatoria.
L2,4		No se encuentran ooquistes
L2,5		Se encuentran muy pocas estructuras con las características de los ooquistes.

L2,6		Se encuentran pocas estructuras.
L2,7		No se encuentran ooquistes.
L2,8		Se encuentran estructuras similares pero no confirmatorias.
L2,9		Se encuentra un posible ooquiste
L2,10		Las estructuras encontradas son similares pero no confirmatorias.
L2,11		No se encuentran ooquistes.
L2,12		No se encuentran ooquistes.

Conclusiones: En un total de 12 muestras solo 3 presentan ooquistes característicos de *Cryptosporidium*, dando como resultado un 25% de las muestras positivas.

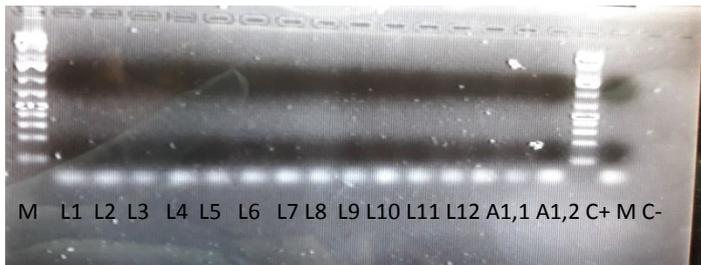
- Resultado cuantificación de ADN con instrumento Qubit (vol. Toma= 5 µl):

MUESTRA	[vol. Toma] (ng/ µl)	[Tubo] (ng/ mL)
L2,1	2,63	65,8
L2,2	0,960	24,0
L2,3	1,60	40,1
L2,4	1,25	31,2
L2,5	4,80	120
L2,6	0,992	24,8
L2,7	0,528	13,2
L2,8	3,04	76,0
L2,9	1,11	27,8
L2,10	9,84	246
L2,11	4,52	113
L2,12	0,744	18,6
A2,1	1,11	27,8
A2,2	1,24	30,9
A1,1	0,322	8,05
A1,2	0,500	12,5

- PCR anidado

Como al momento de realizar el PCR las perlas puReTaq Ready-To-Go se terminaron y el nuevo pedido demoraba en llegar, se realizó el primer round de PCR con unas perlas de misma composición pero distinto sistema de cierre el tubo, las cuales tenían fecha de apertura del 2015.

Como no se sabía si las perlas iban a funcionar, solo se hizo el primer round y se lo reveló por electroforesis donde se vio que no hubo amplificación del control positivo, por lo cual se concluyó que perlas no funcionaron.

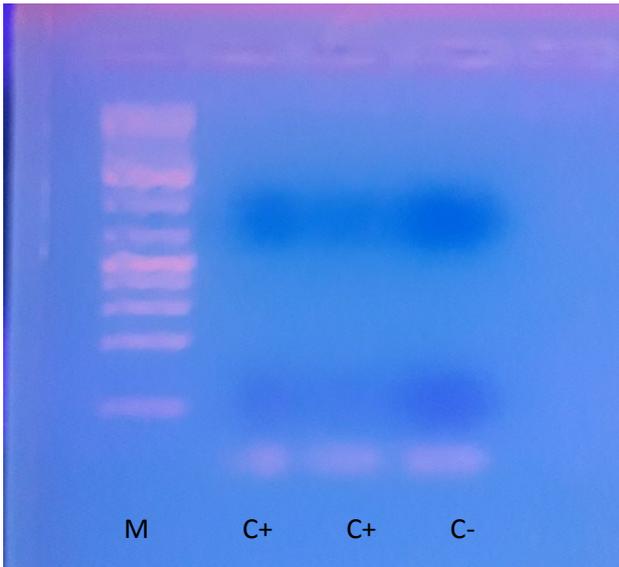


Tras la ver que las perlas no funcionaron, se decidió probar correr un PCR solo con los controles, positivo y negativo, haciendo el mix de reactivos, según las concentraciones y volúmenes indicados por el fabricante de la enzima Taq polimerasa. (12)

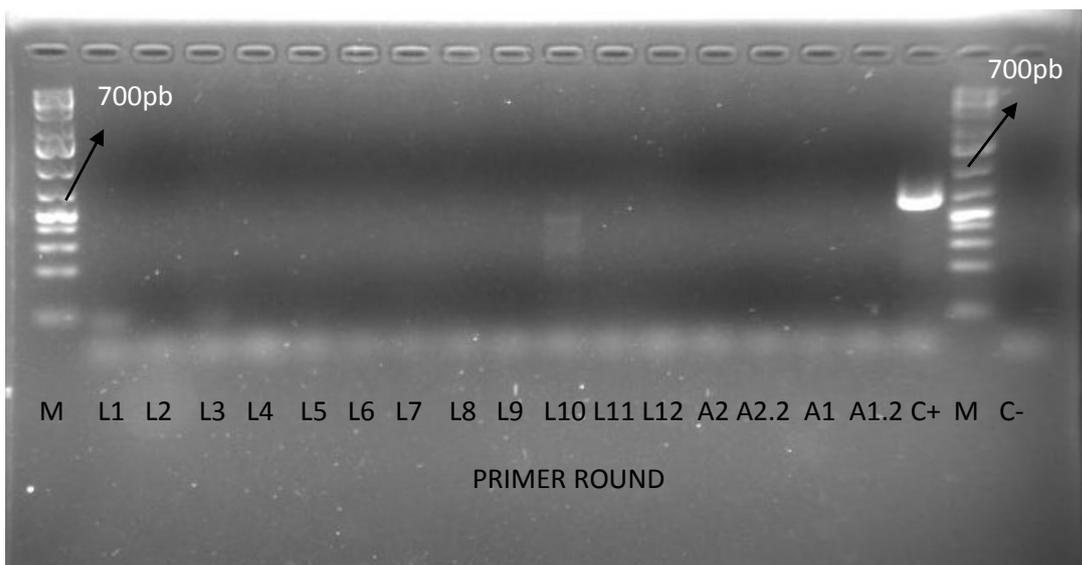
El mix realizado fue el siguiente:

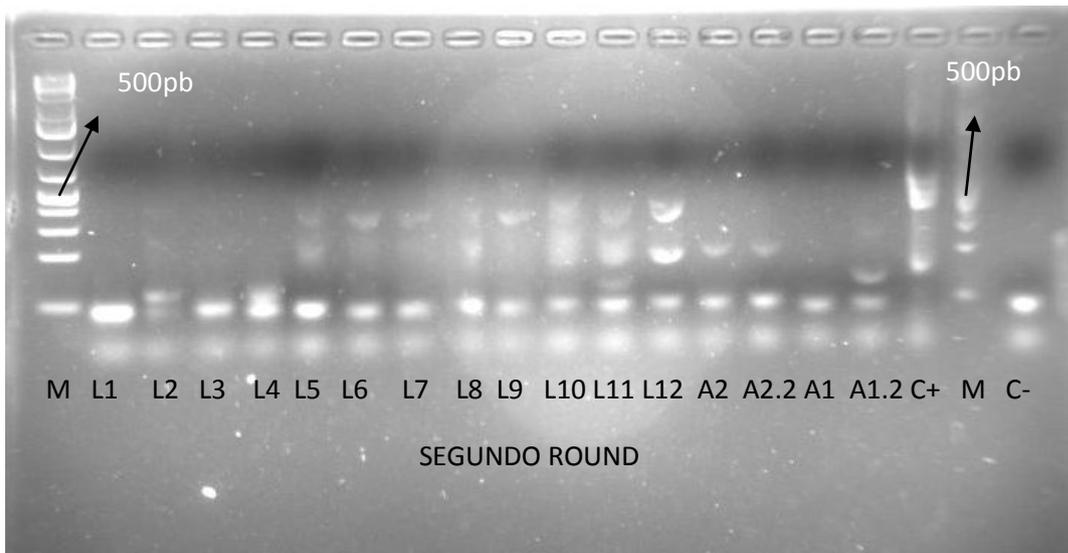
Componente	Volumen para una reacción de 50µL
Buffer	5 µL
Primers	4 µL
dNTP	1 µL
Taq	0,25 µL
MgCl ₂	1,5 µL
ADN target	20 µL
Agua calidad molecular	18,25 µL

Al revelar el producto del PCR se observó que no hubo amplificación, por lo que el mix de reactivos realizado no fue efectivo. Tras este resultado, se decidió esperar la llegadas de las nuevas perlas, guardando las extracciones de ADN de las muestras en el freezer a -20°C.



Una vez llegadas las perlas, se realizo el PCR anidado como se planteo desde un principio. Los resultados luego de revelar los productos de ambos rounds por electroforesis fueron los siguientes:





Muestra	1er round	2do round
L2,1	-	-
L2,2	-	-
L2,3	-	-
L2,4	-	-
L2,5	-	+
L2,6	-	+
L2,7	-	+
L2,8	-	+
L2,9	-	+
L2,10	-	+
L2,11	-	+
L2,12	-	+
A2,1	-	-
A2,2	-	-
A1,1	-	-
A1,2	-	-
C+	+	+
C-	-	-

Conclusión: Al revelar los productos de ambos PCR, se observan bandas en los productos de amplificación correspondientes al segundo round para 8 de las 12 muestras de lechuga analizadas en total.

Al obtener amplificación solo en el segundo round en las muestras positivas, se evidencia el aumento de sensibilidad propuesto por la variante del método anidado, por lo que lo hace efectivo frente a muestras con baja cantidad de ooquistes.

A su vez, los resultados para las muestras de agua de riego de ambos establecimientos, no evidencian amplificación, concluyendo la ausencia de *Cryptosporidium* en los 250mL de muestra ensayados.

9.3. Comparación de resultados

A continuación se plantean los resultados obtenidos por las distintas metodologías para las muestras de ambos establecimientos con el fin de evaluar la concordancia de los resultados.

➤ Resultados establecimiento N°1

Muestra	Tinción ZN	PCR	
		1er round	2do round
L1,1	+	+	-
L1,2	+	-	+
L1,3	+	-	-
L1,4	+	+	+
L1,5	+	-	+
L1,6	+	+	+
L1,7	+	-	+
L1,8	+	+	+
L1,9	+	+	+
C+ susp	NC	+	+
C+ kit	NC	-	-
C-	NC	-	-

Muestra	IFD	ADN extraído (ng/ µl)	PCR	
			1er round	2do round
A1,1	-	0,322	-	-
A1,1	-	0,500	-	-

➤ Resultados establecimiento N°2

Muestra	Tinción ZN	ADN extraído (ng/ µl)	PCR	
			1er round	2do round
L2,1	-	2,63	-	-
L2,2	-	0,960	-	-
L2,3	-	1,60	-	-
L2,4	-	1,25	-	-
L2,5	+	4,80	-	+
L2,6	+	0,992	-	+
L2,7	-	0,528	-	+
L2,8	-	3,04	-	+

L2,9	+	1,11	-	+
L2,10	-	9,84	-	+
L2,11	-	4,52	-	+
L2,12	-	0,744	-	+
C+ susp	NC	0,0884	+	+
C-	NC	NC	-	-

Muestra	IFD	ADN extraído(ng/ µl)	PCR	
			1er round	2do round
A2,1	-	1,11	-	-
A2,1	-	1,24	-	-

Para el establecimiento N°1, el 100% de las muestras de lechuga procesadas contenían ooquistes de *Cryptosporidium* tras su observación microscópica luego de aplicar la tinción Ziehl Neelsen. Sin embargo, tras realizar el PCR anidado a las mismas muestras, solo un 77% de las mismas dieron positivo a la presencia del gen COWP (proteína de la membrana externa de la pared del ooquiste).

Para el establecimiento N°2, solo en el 25% de las muestras de lechuga se encontró presencia de ooquistes por el método de tinción ZN, y por el método PCR un 67% de las muestras dieron positivo a la presencia del gen COWP. Sin embargo, se puede relacionar la ausencia de amplificación en el primer round de PCR para las muestras positivas, con la reducida cantidad de ooquistes encontrados en las muestras positivas tras la tinción ZN, pudiendo concluir que los ooquistes presentes son reducidos.

Esta diferencia de resultados entre los métodos, se puede deber a que se parte del mismo pellet de muestra, para la realización de la tinción ZN así como para la extracción de ADN, por lo que la cantidad total de ooquistes que puedan estar presentes en el pellet puede no ser repartida homogéneamente entre las tomas para los respectivos ensayos. Una forma posible de haber eliminado este factor, hubiera sido el procesamiento de las muestras por duplicado, resultando en la obtención de dos pellet por muestra y así utilizar todo el volumen concentrado para cada ensayo. Como las muestras eran compartidas con otra investigación, no se contaba con la cantidad suficiente de muestra como para procesarlas por duplicado, por lo que tuvo que ensayarse de esta manera.

En cambio, en las muestras de agua de riego, tanto del establecimiento N°1 como del N°2, hay concordancia en los resultados obtenidos por ambas metodologías, en lo cual pudo haber contribuido el hecho de que las muestras, en este caso, si fueron procesadas por duplicado.

Aun así, el método validado para el procesamiento de las lechugas fue el de la tinción Ziehl Neelsen, así como fue el de la tinción por inmunofluorescencia directa para las muestras de agua de riego, por lo que se toman en cuenta los resultados obtenidos con estas metodologías para la conclusión final.

Conclusión

Se logra, en primer lugar, evaluar la respuesta de las metodologías planteadas ante su aplicación a las matrices de estudio, permitiendo establecer el método de centrifugación como forma de recuperar y concentrar los ooquistes de *Cryptosporidium spp* presentes en muestras de lechuga, para su posterior detección mediante la observación microscópica de la tinción, ácido alcohol resistente (AAR), Ziehl Neelsen, o mediante la extracción de ADN para la posterior realización del PCR. Cabe destacar, que el proceso de recuperación de ooquistes por centrifugación, es una tarea laboriosa, la cual requiere mucho tiempo y dedicación por parte del analista, por lo que puede no resultar un método del todo rentable ante su aplicación como una metodología de análisis rutinario.

En cuanto al análisis de las muestras de agua, se estableció el método de filtración directa como forma de recuperar y concentrar los ooquistes, para proceder a su detección a través de la observación en un microscopio de fluorescencia, la tinción por inmunofluorescencia directa.

Lo que concierne a la validación de las metodologías ópticas, para ambas se logró establecer un límite de detección de 25 oq/ μ L, el cual constituye un valor mayor a la posible dosis infectiva detectada para ciertas especies de *Cryptosporidium*. Por lo que se plantea como posible continuación de esta investigación, la disminución del límite de detección de estas metodologías.

En relación a la cantidad de establecimientos propuestos para la extracción de muestras, el tiempo de pasantía alcanzó para la realización del muestreo solamente en dos lugares, en vez de tres, que era el mínimo deseado. Por lo que los resultados obtenidos no llegan a ser suficientes para establecer la prevalencia del parásito buscado. En cambio, sí nos permiten saber que nuestro país no es ajeno a la existencia de *Cryptosporidium spp*, ya que el 100% de las muestra de lechuga procesadas del establecimiento N°1 y el 25% de las muestras del establecimiento N°2, dieron como resultado presencia de ooquistes mediante la detección por tinción Ziehl Neelsen modificado.

Sin embargo, el análisis de las aguas destinadas al riego de ambos establecimientos muestreados, presentaron ausencia de ooquistes, por lo que no se pudo establecer relación en cuanto a causal de contaminación de los cultivos. Tampoco se pudo concluir que la causa de la presencia de los ooquistes en las muestras de lechuga fuera por contaminación con materia fecal, ya que el recuento de microorganismos indicadores, coliformes fecales, fue < 3 NMP/g en todas las muestras de lechuga de ambos establecimientos.

A su vez, es de importancia mencionar, que ninguno de estos métodos detecta la especie de *Cryptosporidium* dominante en las muestras positivas, lo cual puede realizarse secuenciando los productos de PCR obtenidos a genes específicos. Otro posible objetivo si se continuara la investigación en un futuro.

Autoevaluación

A pesar de que cuando se me fue propuesta la investigación, no contaba con los conocimientos necesarios para el cumplimiento de los objetivos establecidos, al punto de no saber que era de *Cryptosporidium*, considero haber tenido un buen desempeño durante el transcurso de la pasantía. Tuve que comenzar estudiando las metodologías, ya que no conocía el fundamento teórico de la tinción por inmunofluorescencia ni las de PCR anidado, así como comprender el ciclo de vida de este parásito tan peculiar.

No fue tarea fácil llegar al punto tal de conocimiento del ooquiste, que me permitiera identificarlo ante la tinción de una muestra como la lechuga, que presenta suciedad además de otros microorganismos. Requirió de muchas horas tras el microscopio, motivo de broma por parte de compañeros del sector, que me llamaban mamá de los Crypto. A decir verdad, hasta les tome cariño.

Fue una experiencia muy enriquecedora, tanto a nivel profesional, como a nivel personal. Aprendí a realizar un PCR a tiempo final, con todo lo que eso conlleva, a manejar un microscopio de fluorescencia, gane confianza en mi capacidad de desarrollo de análisis y comprendí lo que era formar parte de una investigación.

Cabe mencionar, que las relaciones laborales fueron muy buenas, tanto con pares como con superiores, así como la excelente comunicación con la tutora empresarial. El LATU se destaca por el buen recibimiento y oportunidades que les brinda a estudiantes para comenzar su carrera profesional.

Para finalizar, me gustaría mencionar algunos aspectos que debo mejorar en próximos trabajos de este tipo:

- Realizar una bitácora más clara y ordenada de trabajo.
- Ir analizando datos y sacando conclusiones a medida que se van obteniendo resultados.
- Tomarme más tiempo de planificación para las tareas que deba realizar

Bibliografía

1. **LATU.** [En línea] 2017. <http://www.latu.org.uy/institucional/acerca>.
2. *Cryptosporidium pathogenicity and virulence. Clin Microbiol Rev.* **Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM.** 2013.
3. UNAM,
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/criptosporidiasis.html>.
4. **OIE.** Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2008.
5. **Atias, Dr. Antonio.** Parasitología medica.
6. Ines Helena Vásquez G, Marcos Restrepo I., David Botero, Biomédica Vol. 6, Nos. 1 y 2 – 1986.
7. **Rodríguez, Juan Carlos y Royo, Gloria.** Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Elche.
8. Estude medicina, <http://estudiemedicina.blogspot.com.uy/2011/06/ziehl-neelsen.html>.
9. **Tananta, Iris.** *Presencia de enteroparasitos en lechuga (Lactuca sativa) en establecimientos de consumo publico de alimentos del distrito de cercado de Lima.* Lima-Perú : s.n., 2002.
10. Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. [aut. libro] Wojciech Pawlina Michael H. Ross. s.l. : Ed. Médica Panamericana, 2007.
11. **EPA.** Method 1622: Cryptosporidium in Water by Filtration/IMS/FA. 2005, 11.0;14.0.
12. Waterborn, Inc., <http://waterborneinc.com/crypt-a-glo/>. [En línea]
<http://waterborneinc.com/crypt-a-glo/a400flk-crypt-a-glo-comprehensive-kit>.
13. *“Implementación de métodos moleculares y microscópicos para estudios clínicos y ambientales relativos a Cryptosporidium sp. en Uruguay”.* **Rey, F., Acosta, S., Martínez, W., Lena, A., Tort, C., Acuña, A., Míguez, D., Ureta, A.** 12 (34 - 47), s.l. : REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY, 2016.

14. **Scientific, Thermo.** PRODUCT INFORMATION Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. 2016. MAN0013047.
15. Waterborne,INC. *Crypt-a-Glo™ G/C Direct Comprehensive Kit* . [En línea]
https://static1.squarespace.com/static/55751402e4b017c5045aa9a0/t/5720246b86db43476f5e934a/1461724267875/A400FLK_prod_insert-1.pdf.
16. *Detección de enteroparásitos en lechgas que se comercializan en el estado Lara, Venezuela.* **Travieso-Valles, y otros.** 2013. ISSN 2219-8032.
17. Analytical Biotech. [En línea] <https://analyticalbiotech.wordpress.com/pcr-anidada/>.
18. **Merck.** Ficha de datos de seguridad: Verde de malaquita. [En línea]
file:///C:/Users/narel/Downloads/115942_SDS_ES_ES.PDF.
19. Hoja de datos de seguridad Fenol cristalizado. [En línea]
<https://www.ctr.com.mx/pdfcert/Fenol.pdf>.
20. **Merck.** Ficha de datos de seguridad: Fucsina. [En línea]
file:///C:/Users/narel/Downloads/115937_SDS_ES_ES.PDF.
21. Hoja de datos de seguridad: Ácido sulfurico . [En línea] http://iio.ens.uabc.mx/hojas-seguridad/acido_sulfurico.pdf.
22. Ficha de datos de seguridad: Metanol. [En línea]
<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/0a100/nspn0057.pdf>.
23. **Instituto de Salud Pública, Chile.** *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la.*

ANEXO I: Plan de seguridad

➤ Riesgo biológico

El riesgo biológico asociado a esta investigación es alto, debido a que manipulan organismos vivos capaces de infectar si no se los maneja con las precauciones necesarias.

Por este motivo, el analista que este en contacto con este microorganismo, debe conocer las características del mismo y saber cuáles son las condiciones correctas de manipulación. Por esto se establecen a continuación ciertas pautas a seguir a la hora de manipular material contaminado, o que se crea que lo este, con oocistos de *Cryptosporidium*:

- Ingresar al laboratorio microbiológico con túnica, sobre túnica y cofia.
- Utilizar guantes
- No comer ni beber dentro del laboratorio
- Descartar el material de desecho contaminado en bolsas plásticas aptas a ser sometidas a proceso de esterilización para desinfección.
- El material reutilizable contaminado, someterlo a proceso de esterilización previo al lavado

➤ Riesgo químico

Teniendo en cuenta que para la aplicación de la tinción Ziehl Neelsen se utilizan reactivos catalogados como peligrosos, se recomienda la lectura de las hojas de seguridad previo a su preparación o utilización.

A continuación se resumen los pictogramas de seguridad así como los peligros asociados a los reactivos con los que se debe tener mayor precaución:

Reactivos	Pictogramas de seguridad	Peligros asociados
Fenol		Tóxico en caso de inhalación. Tóxico en contacto con la piel. Tóxico en caso de ingestión. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones

		oculares graves. Puede provocar daños en los órganos. Se sospecha que provoca defectos genéticos.
Fucsina básica		Puede provocar cáncer.
Verde de malaquita		Tóxico en caso de ingestión. Provoca lesiones oculares graves. Se sospecha que daña al feto. Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
Metanol		Por inhalación produce tos, vértigo y dolor de cabeza. Puede absorberse por la piel. Al ingerir produce dolor abdominal y vómitos.
Ácido sulfúrico		Por inhalación puede presentar irritación, quemaduras, dificultad respiratoria. Provoca quemaduras severas y profundas.

(18), (19), (20), (21), (22)

Teniendo en cuenta el peligro que presentan estas sustancias, se plantea que se sigan las siguientes recomendaciones para minimizar los riesgos:

- Utilizar túnica y guantes de nitrilo en todo momento que se vaya a estar en contacto con los reactivos

- Incluso en el momento de aplicar la tinción, se recomienda el uso de lentes de seguridad y tapaboca, así como realizar la misma en un ambiente con buena ventilación y con poca recurrencia, ya que emana vapores con fuertes olores.
- El analista de ser posible debe esperar a que se culmine el tiempo de tinción en otra habitación.
- Descartar las aguas de lavado en un bidón apto para su posterior descarte según la reglamentación del laboratorio.

ANEXO II: Datos experimentales y tratamiento de datos

- Formulas para los cálculos para la preparación de suspensiones de ooquistes de trabajo recuento en cámara de Neubauer.

$$Ci * Vt = Cf * Vf$$

Donde:

- *Ci* (Concentración inicial de ooquistes)
- *Vt* (Volumen de toma)
- *Cf* (Concentración final de ooquistes)
- *Vf* (Volumen final de suspensión)

- Recuento en cámara de Neubauer y tratamiento estadístico.

$$\frac{\text{Número de ooquistes contados} * Vfsusp}{\text{Superficie contada(mm}^2\text{)} * \text{profundidad de la camara(mm)} * Vtsusp.inicial} = Oq/\mu L$$

El promedio de los recuentos realizados se calcula de la siguiente manera (23):

$$X = \frac{\sum xi}{n}$$

Siendo:

- *xi* = valor de una lectura.

- n = numero de lecturas

La desviación estándar de los recuentos obtenidos se calcula (23):

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Siendo:

- xi = valor de una lectura.
- X= promedio de la totalidad de lecturas.
- n = numero de lecturas

Calculo del % de desviación estándar relativa (RSD):

$$RSD = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

- Verificación de [susp. Stock] mediante recuento en cámara de Neubauer

[Ooquistes comerciales] inicial= 10^9 oq/10mL = 10^8 oq/1mL = 10^5 oq/ μ L

$$10^5 \frac{oq}{\mu L} * V_t = 10^3 \frac{oq}{\mu L} * 100\mu L \rightarrow V_t = 1\mu L$$

N° alícuota	Recuento	oq/ μ L
1	10	2500
2	9	2250
3	10	2500
4	9	2250
5	10	2500
6	8	2000
Promedio (oq/ μL)		$2,3 \times 10^3$
Desviación estándar		204,124145

RSD (%)	8,7< (16%)
----------------	------------

→ Recuento de suspensión para inóculo de L1 y L2

Suspensión intermedia:

$$10^5 \frac{oq}{\mu L} * V_t = 10^4 \frac{oq}{\mu L} * 100\mu L \rightarrow V_t = 10\mu L$$

N° alícuota	Recuento	oq/ μ L
1	194	4850
2	216	5400
3	197	4925
4	194	4850
5	200	5000
6	205	5125
Media (oq/ μL)	5,0x10 ³	
Desviación estándar	210,950231	
RSD (%)	4,2 (<16%)	

→ Recuento susp. de trabajo para prueba N°1

$$10^3 \frac{oq}{\mu L} * V_t = 10^2 \frac{oq}{\mu L} * 200\mu L \rightarrow V_t = 20\mu L$$

N° alícuota	Recuento	oq/ μ L
1	27	6,7x10 ²
2	28	7,0 x10 ²
3	25	6,2 x10 ²

4	28	7,0 x10 ²
5	27	6,7 x10 ²
6	22	5,5 x10 ²
Media (oq/ μL)	6,5 x10 ²	
Desviación estándar	57,9151678	
RSD (%)	8,8 (<16%)	

→ Recuento para prueba 2

N° alícuota	Recuento	oq/μL
1	20	5,0x10 ²
2	26	6,5 x10 ²
3	22	5,5 x10 ²
4	25	6,2 x10 ²
5	22	5,5 x10 ²
6	23	5,7 x10 ²
Media (oq/ μL)	5,7 x10 ²	
Desviación estándar	54,7722558	
RSD (%)	9,5 (<16%)	

→ Recuento de suspensiones para prueba N° 3

Susp. Intermedia 10³ oq/ μL

$$10^5 \frac{\text{oq}}{\mu\text{L}} * V_t = 10^3 \frac{\text{oq}}{\mu\text{L}} * 100\mu\text{L} \rightarrow V_t = 1\mu\text{L}$$

N° alícuota	Recuento	oq/μL
1	8	2,0x10 ³
2	10	2,5 x10 ³
3	10	2,5 x10 ³
4	9	2,2 x10 ³
5	8	2,0 x10 ³
6	10	2,5 x10 ³

Media (oq/ μL)	2,3 x10 ³
Desviación estándar	245,79802
RSD (%)	10,7(<16%)

Susp. Trabajo 10²oq/μL

$$10^3 \frac{oq}{\mu L} * V_t = 10^2 \frac{oq}{\mu L} * 100\mu L \rightarrow V_t = 10\mu L$$

N° alícuota	Recuento	oq/μL
1	6	1,5x10 ²
2	5	1,2 x10 ²
3	4	1,2 x10 ²
4	5	1,2 x10 ²
5	4	1,0 x10 ²
6	6	1,5 x10 ²
Media (oq/ μL)		1,3 x10 ²
Desviación estándar		18,8193163
RSD (%)		14,6(<16%)

→ Recuento de suspensiones para validación de metodología para el análisis de las muestras de lechuga

[Susp. Intermedia]= 10³ oq/μL

N° alícuota	Recuento	oq/μL
1	15	3,7x10 ³
2	14	3,5 x10 ³
3	16	4,0 x10 ³
4	15	3,7x10 ³
5	13	3,2 x10 ³
6	15	3,7x10 ³
Media (oq/ μL)		3,6 x10 ³
Desviación estándar		258,19889
RSD (%)		7,0(<16%)

[Susp. Trabajo]= 10² oq/μL

N° alícuota	Recuento	oq/μL
1	1	25
2	1	25
3	1	25
4	1	25
5	1	25
6	1	25
Media (oq/ μL)	25	
Desviación estándar	0	
RSD (%)	0 (<16%)	

Observación: Según recuento realizado la concentración obtenida tras la dilución es 25 oq/ μL, en vez de 10² oq/μL, por lo que se sigue la realización de la siguiente susp. de trabajo a partir de esta concentración. Esto puede deberse a una mala homogenización de la suspensión de partida.

[Susp. Trabajo]= 10 oq/μL

$$25 \frac{oq}{\mu L} * V_t = 10 \frac{oq}{\mu L} * 80\mu L \rightarrow V_t = 32\mu L$$

N° alícuota	Recuento	oq/μL
1	1	6,2
2	1	6,2
3	1	6,2
4	1	6,2
5	1	6,2
6	1	6,2
Media (oq/ μL)	6,2	
Desviación estándar	0	
RSD (%)	0 (<16%)	

→ Recuento de suspensiones para validación del método de tinción por inmunofluorescencia directa a partir de la suspensión del control positivo del kit:

$$[\text{Susp. inicial}] = 2 \times 10^5 \text{ oq/mL} \implies 2,0 \times 10^2 \text{ oq/}\mu\text{L}$$

Recuento para comprobar la concentración inicial, se contó solamente una alícuota porque el volumen de suspensión disponible era limitado y debía quedar para la realización de controles positivos:

N° alícuota	Recuento	oq/ μL
1	84	$2,1 \times 10^2$

Susp. Intermedia de 50 oq/ μL

$$2,0 \times 10^2 \frac{\text{oq}}{\mu\text{L}} * V_t = 50 \frac{\text{oq}}{\mu\text{L}} * 80 \mu\text{L} \rightarrow V_t = 20 \mu\text{L}$$

N° alícuota	Recuento	oq/ μL
1	8	80
2	10	$1,0 \times 10^2$
3	9	90
4	8	80
5	9	90
6	9	90
Media (oq/ μL)		88
Desviación estándar		7,52772653
RSD (%)		8,5 (<16%)

Suspensión de trabajo 20 oq/ μL

$$1,0 \times 10^2 \frac{\text{oq}}{\mu\text{L}} * V_t = 20 \frac{\text{oq}}{\mu\text{L}} * 80 \mu\text{L} \rightarrow V_t = 16 \mu\text{L}$$

N° alícuota	Recuento	oq/ μL
1	2	25
2	2	25
3	2	25
4	2	25
5	2	25
6	2	25
Media (oq/ μL)		25
Desviación estándar		0

RSD (%)	0 (<16%)
----------------	----------

Observación: es posible que no coincida el recuento con las diluciones planteadas por un problema de homogenización de la suspensión de partida

→ Recuento de suspensiones para la prueba N° 5

[Susp. Stock]= 10^5 oq/ μL [susp. int.] = 10^3 oq/ μL [susp. Trabajo]= 10^2 oq/ μL y 10 oq/ μL

$$10^5 \frac{\text{oq}}{\mu\text{L}} * V_t = 10^3 \frac{\text{oq}}{\mu\text{L}} * 100\mu\text{L} \rightarrow V_t = 1\mu\text{L}$$

$$10^3 \frac{\text{oq}}{\mu\text{L}} * V_t = 10^2 \frac{\text{oq}}{\mu\text{L}} * 100\mu\text{L} \rightarrow V_t = 10\mu\text{L}$$

$$10^2 \frac{\text{oq}}{\mu\text{L}} * V_t = 10 \frac{\text{oq}}{\mu\text{L}} * 70\mu\text{L} \rightarrow V_t = 7\mu\text{L}$$

N° alícuota	Recuento	oq/ μL
1	10	$2,5 \times 10^3$
2	10	$2,5 \times 10^3$
3	8	$2,0 \times 10^3$
4	9	$2,2 \times 10^3$
5	10	$2,5 \times 10^3$
6	8	$2,0 \times 10^3$

Media (oq/ μL)	$2,3 \times 10^3$
Desviación estándar	245,79802
RSD (%)	11 (<16%)

N° alícuota	Recuento	oq/ μL
1	7	$1,7 \times 10^2$
2	6	$1,5 \times 10^2$
3	7	$1,7 \times 10^2$
4	7	$1,7 \times 10^2$
5	5	$1,2 \times 10^2$
6	7	$1,7 \times 10^2$

Media (oq/ μL)	$1,6 \times 10^2$
Desviación estándar	20,9165007
RSD (%)	13 (<16%)

N° alícuota	Recuento	oq/ μL
-------------	----------	-------------------

1	1	25
2	1	25
3	1	25
4	1	25
5	2	25
6	1	25
Media (oq/ µL)		25
Desviación estándar		0
RSD (%)		0 (<16%)

ANEXO III: Preparación de reactivos

→ Preparación H₂SO₄ 2%

Datos:

- Pf= 98,08 g/mol
- 1L= 1,84 Kg ≅ 1840g

$$n = \frac{m(g)}{Pf} = \frac{1840g}{\frac{98,08g}{mol}} = \frac{18,7606mol}{1L} = 18,7602M$$

$$\% \frac{m}{v} * Pf * \frac{100ml}{1L} = M = \frac{2g}{100ml} * \frac{1mol}{98,08g} * \frac{1000ml}{1L} = 0,20391517M$$

$$[H_2SO_4]_{conc} * V_t = [H_2SO_4]_{2\%} * V_f$$

$$V_t = \frac{200mL * 0,20391517M}{18,7602} = 2,17 ml$$

→ Preparación verde de malaquita 5%

Pesar 5g de verde de malaquita puro y llevar a 100mL de agua destilada estéril.

→ Dilución al 0,4% desde solución de 5% de verde de malaquita

$$C_i * v_t = C_f * V_f = 5\% * v_t = 0,4 * 100 \rightarrow V_t = 8mL$$

Tomar 8 mL de la solución de 5% y llevar a 100 mL con agua destilada.

→ Preparación Tween 20 al 0,01%

$$100\% * vt = 0,01\% * 10mL \rightarrow Vt = 0,001mL \cong 1\mu L$$

Tomar 1 μ L de Tween puro previamente esterilizado diluir en 10 mL de agua destilada estéril.

→ Preparación buffer de lisis

Composición: 100mM Tris pH8, 100mM EDTA, 100mM NaH₂PO₄, 2M NaCl, 1% CTAB

➤ Tris 0,1M

$$[Tris]conc * vol(L) = mol$$

$$mol * Pf = masa$$

$$\% \frac{m}{m} = \frac{msa(g)}{mmtra(g)} * 100$$

$$\frac{0,1mol}{L} * 100x10^{-3}L = 0,01mol * 121,14 = 1,2114g$$

$$99,8\% = \frac{1,2114}{mmtra} * 100 \rightarrow mmtra = 1,2138g$$

Pesar 1,2138g y llevar a 100 mL con agua destilada

➤ EDTA 0,1M

$$\frac{0,1mol}{L} * 100x10^{-3}L = 0,01 * 292,24 = 2,9224g$$

$$98,5\% = \frac{2,9224}{mmtra} * 100 \rightarrow mmtra = 2,9669g$$

Pesar 2,9669g y llevar a 100 mL con agua destilada

➤ NaCl 2M

$$\frac{2mol}{L} * 100x10^{-3}L = 0,2 * 58,44 = 11,688g$$

$$99,5\% = \frac{11,688}{mmtra} * 100 \rightarrow mmtra = 11,7467g$$

Pesar 11,7467g y llevar a 100mL con agua destilada

➤ CTAB 1%

[Inicial]= 100%

$$100\% = \frac{msa}{100mL} = 1g$$

Pesar 1 g y llevar a 100mL de agua destilada.

Esterilizar el buffer de lisis por medio de filtración con membrana de 0,22µm.

➤ NaH₂PO₄.H₂O 100mM

$$\frac{0,1mol}{1L} * 100 \times 10^{-3} = 0,01mol * 137,99 = 1,3799g$$

$$99,6\% = \frac{1,3799}{mmtra} * 100 \rightarrow 1,3854g$$

Pesar 1,3854g y llevar a un volumen final de 100mL con agua destilada.

→ Toma de Proteinasa K para 100µg/mL

$$20000\mu g * Vt = 100\mu g * 1mL \rightarrow 5\mu L$$

Tomar 5µL al momento de realizar la extracción de ADN

→ Toma RNasa A para 50µ/mL

$$10000\mu g * Vt = 50\mu g * mL \rightarrow 5\mu L$$

Tomar 5µL de RNasa A para cada extracción

→ Lisozima 100µg/mL

$$1 \times 10^3 * Vt = 100\mu * 1mL \rightarrow 0,1mL$$

Tomar 0,1 mL para cada extracción

→ Preparación de dNTP 10mM para mix de PCR

[A], [T], [G] y [C]= 100mM

$$100mM * Vt = 10mM * 50\mu L \rightarrow 5\mu L$$

Tomar 5 µL c/u y llevar a 50 µL con agua calidad molecular.

ANEXO IV: Galería de imágenes del procesamiento de muestras

