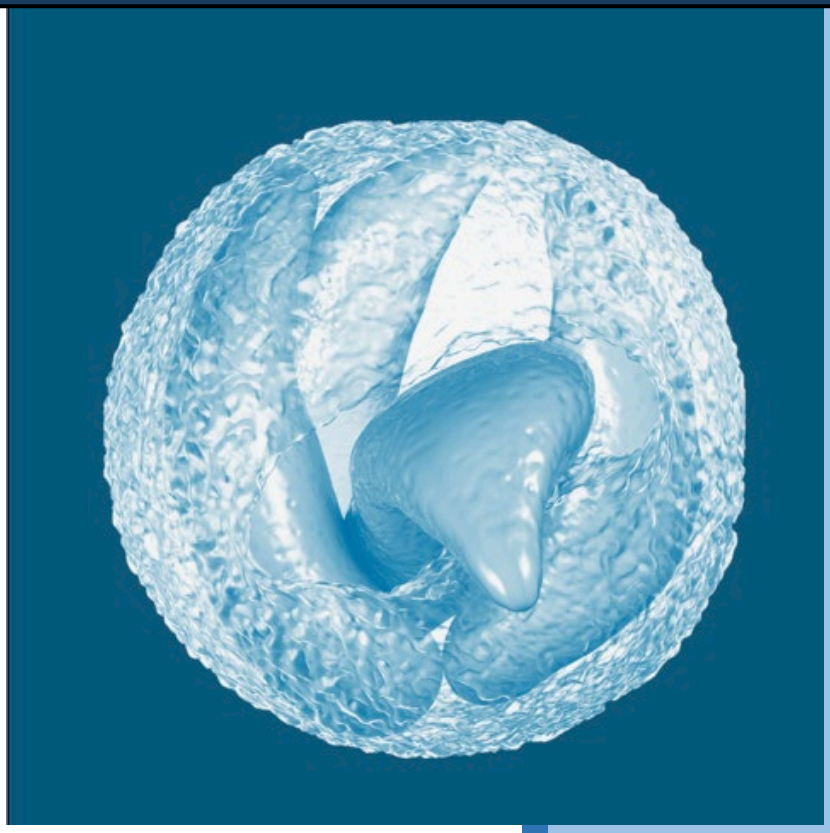
Recomendaciones ante la presencia de Cryptosporidium en agua



Recomendaciones ante la presencia de Cryptosporidium en agua

Ni el Ministerio de Sanidad ni los autores son responsables del uso que pueda hacerse del contenido de esta publicación, o por cualquier error que, a pesar de una cuidadosa preparación y verificación, pueda aparecer.

@ MINISTERIO DE SANIDAD
Secretaria General Técnica
Centro de Publicaciones
Paseo del Prado, 18, 28014 Madrid
Nipo CD Rom:
Nipo en línea:
El Copyright y otros derechos de la propiedad intelectual de este documento pertenecen al Ministerio de Sanidad. Se autoriza a las organizaciones de atención sanitaria a reproducirlo total o parcialmente para su uso no comercial, siempre que se cite el nombre completo del documento, año e institución.
Catálogo general de publicaciones oficiales
http://www.O6O.es
2025

Director General de Salud Pública y Equidad en Salud
Pedro Gullón Tosio

Subdirector General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral
Santiago González Muñoz

Coordinación general:
Margarita Palau Miguel. Ministerio de Sanidad
Esperanza Ligia Guevara Alemany. Ministerio de Sanidad
Consuelo Hontanaya Díaz. Ministerio de Sanidad
Andrés G. Suárez Alonso. Ministerio de Sanidad

Coordinación por temas:
Muestreo y métodos de análisis. **David Carmena Jiménez**. Centro Nacional de Microbiología (ISCIII)
Abastecimientos con ETAP. **Rafael Rubio Pancorbo**. Junta de Andalucía
Abastecimientos sin ETAP. **Mª Icíar Alonso Urreta**. Gobierno de Aragón
Piscinas e instalaciones de uso recreativo. **Irene Corbella i Cordomí**. Generalitat de Catalunya

Autores/as:
Muestreo y métodos de análisis
David Carmena Jiménez. Centro Nacional de Microbiología (ISCIII)
Marisa Camaró Sala. Generalitat Valenciana
Mª Carmen Aguilar Mármol. Generalitat de Catalunya
Silvia Cianca Peña. Gobierno de Navarra
Leopoldo Lucio Mero. Junta de Extremadura
Mª Ángeles Roca Vela. Gobierno de Aragón
Andrés G. Suárez Alonso. Ministerio de Sanidad

Abastecimientos con ETAP
Rafael Rubio Pancorbo. Junta de Andalucía
Paloma Medrano Perales. Comunidad de Madrid
Patricia Ciria Esteban. Gobierno de Aragón
Gonzalo Lozano López. Junta de Extremadura
Andrés G. Suárez Alonso. Ministerio de Sanidad

Abastecimientos sin ETAP
Mª Icíar Alonso Urreta. Gobierno de Aragón
Manuel Álvarez Cortinas. Xunta de Galicia
Paula Sánchez García. Xunta de Galicia
Andrés G. Suárez Alonso. Ministerio de Sanidad

Piscinas e instalaciones de uso recreativo
Irene Corbella i Cordomí. Generalitat de Catalunya
Elena Navarro Calderón. Generalitat Valenciana
Cristina Saldaña Zabalegui. Gobierno de Navarra
Laura Guerrero Latorre. Generalitat de Catalunya
Andrés G. Suárez Alonso. Ministerio de Sanidad

ÍNDICE GENERAL

1. *Cryptosporidium* y criptosporidiosis 8

2. Presencia de *Cryptosporidium* en agua 14

3. Presencia de *Cryptosporidium* en abastecimientos con ETAP 21

4. Presencia de *Cryptosporidium* en abastecimientos sin ETAP 34

5. Presencia de *Cryptosporidium* en piscinas e instalaciones de uso recreativo 40

6. Procedimiento para la detección y recuento de ooquistes de *Cryptosporidium* en aguas de consumo humano y piscinas 52

7. Simulación de evaluación de riesgo hídrico cuantitativo para *Cryptosporidium* 75

8. Bibliografía 84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hospedadores, principales y secundarios, de especies y genotipos de *Cryptosporidium* descritas en el ser humano. Fuente: cortesía David Carmena (adaptado de Fredes Martínez, 2016)... 9

Tabla 2. Algunos brotes de criptosporidiosis por agua de consumo en los que se estudió el origen de la presencia del parásito en el agua de consumo (adaptado de Organización Mundial de la Salud, 2009) y otros reportados en bibliografía más reciente..... 15

Tabla 3. Brotes de criptosporidiosis en piscinas e instalaciones de uso recreativo 17

Tabla 4. Valores de CT para la inactivación de *Cryptosporidium* con dióxido de cloro (mg/L x min) (USEPA, 1999)..... 26

Tabla 5. Valores de CT para la inactivación del 99% (2 log) para varios microorganismos con ozono. 26

Tabla 6. Valores de CT para la inactivación de *Cryptosporidium* con ozono (mg/L x min) (USEPA, 1999) 27

Tabla 7. Dosis para alcanzar una inactivación del 99% (2 log) de varios microorganismos con radiación UV 27

Tabla 8. Valores de CT para la inactivación de *Cryptosporidium* con radiación UV (mJ/cm^2) (USEPA, 1999)..... 27

Tabla 9. Eficiencia en la eliminación de *Cryptosporidium* de diferentes procesos del tratamiento [adaptado de USEPA *Cryptosporidium*: Drinking Water Health Advisory, 2001]..... 28

Tabla 10. Ejemplo de un programa de monitoreo operativo (características y frecuencias)..... 29

Tabla 11. Rango de volúmenes de agua recomendado para la detección y recuento de ooquistes de *Cryptosporidium* en función del tipo de muestra 55

Tabla 12. Estudios experimentales y de campo en los que se ha utilizado PCR (en sus diferentes variantes) para la detección y cuantificación de ooquistes de *Cryptosporidium* en diferentes matrices acuáticas durante el periodo 1996–2023. Se indican los principales parámetros sobre el rendimiento de estos métodos 73

Tabla 13. Recuentos de ooquistes/L de *Cryptosporidium* de las 4 series propuestas 76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo vital de *Cryptosporidium* spp. Fuente: Köster et al. (2024b) 11

Figura 2. Panel 1. Tipos de cartuchos y cápsulas disponibles comercialmente para el filtrado de muestras de agua. a) 3M™ CUNO™; b) Envirochek® HV; c) Filtro Corning. Panel 2. Filtro Corning con su correspondiente portafiltros. Fuente: cortesía David Carmena 54

Figura 3. Panel 1. Equipo estándar para la filtración in situ de muestras de agua. Panel 2. Vista superior de la maleta portátil incluyendo manguera de entrada al circuito con llave para el control de flujo, bomba peristáltica, manómetro 1, manguera de entrada al portafiltros, manguera de salida del portafiltros, manómetro 2, caudalímetro y manguera de salida del sistema. Las flechas amarillas indican el flujo del agua a través del sistema. Panel 3. Punto de muestreo típico de aguas superficiales. Panel 4. Equipo de muestreo operando en condiciones de campo. Fuente: cortesía David Carmena 56

Figura 4. Filtración en el laboratorio de una muestra de agua transportada en un bidón de 50 litros. Fuente: cortesía David Carmena 57

Figura 5. Vista frontal de la cápsula Envirocheck® HV en posición horizontal con la válvula de purga blanca (identificada con una flecha amarilla) en la posición horaria de 12 h. Fuente: cortesía Marisa Camaró Sala 62

Figura 6. Vista frontal de la cápsula Envirocheck® HV en posición horizontal con la válvula de purga blanca (identificada con una flecha amarilla) en la posición horaria de 4 h (panel 1), 12 h (panel 2) y 8 h (panel 3). Fuente: cortesía Marisa Camaró Sala. 63

Figura 7. Separación inmunomagnética en tubos de lado plano incubados en un rotor tipo noria. Fuente: cortesía Marisa Camaró Sala 65

Figura 8. Uso del concentrador de partículas magnéticas Dynal MPC-1. Panel 1: Colocación del tubo de lado plano en el concentrador; Panel 2: Inversión de 90º; Panel 3: Descarte del sobrenadante por decantación. Fuente: cortesía Marisa Camaró Sala 65

Figura 9. Transferencia de las partículas magnéticas aisladas en el concentrador Dynal MPC-1 a viales de 1,5 mL para su posterior lavado en la gradilla magnética Dynal MPC-S. Fuente: cortesía Marisa Camaró Sala 66

Figura 10. Eliminación del exceso de tinción en un portaobjetos de pocillos excavados. Panel 1: Inclinación del portaobjetos en ángulo de 45° para facilitar el proceso de pipeteo. Panel 2: colocando la punta de la pipeta en el borde del pocillo (sin tocar el fondo del mismo) se absorbe el exceso de tinción cuidadosamente. Fuente: cortesía Marisa Camaró Sala 67

Figura 11. Ooquistes de *Cryptosporidium*. Panel 1: Imagen de microscopía de inmunofluorescencia. Panel 2: Imagen de microscopía de inmunofluorescencia con tinción DAPI. Fuente: H.D.A Lindquist, Agencia de Protección Ambiental de E.E. U.U (USEPA) 69

ACRÓNIMOS

CAG	Carbón activo granulado
CCAA	Comunidades Autónomas
CCAES	Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias del Ministerio de Sanidad
CT	Valor de exposición o Factor CT (producto de la Concentración del bactericida en mg/l, como media residual, por el tiempo de contacto T en minutos)
DAF	Flotación por aire disuelto (*Dissolved air flotation*)
DAPI	Diamidino-phenylindol
ETAP	Estación de tratamiento de agua potable
FITC	Fluoresceína
GBD	*Global Burden Disease study*
GEA	Gastroenteritis aguda
ID_{50}	Dosis infectiva media (*Median infective dose*)
LC	Límite Crítico
OMS (*WHO*)	Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*)
PCC	Punto de control crítico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)
Pd	Pared delgada
Pg	Pared gruesa
ppm	Partes por millón
PSA	Plan sanitario del agua
QMRA	Evaluación cuantitativa del riesgo microbiano (*Quantitative microbial risk assessment*)
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
UFC	Unidad formadora de colonias
UNF	Unidad nefelométrica
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. (*US Environmental Protection Agency*)
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

1. Cryptosporidium y criptosporidiosis

1.1. Introducción

1.2. Agente

1.3. Reservorio

1.4. Modo de transmisión

1.5. Patogenicidad

1.6. Control

1.7. Factores que facilitan la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en el ambiente

1.1. Introducción

La criptosporidiosis es una enfermedad gastrointestinal causada por protozoos del género *Cryptosporidium* que puede afectar a humanos y a una amplia diversidad de animales vertebrados e invertebrados (Widmer et al., 2020). Es una de las principales causas de diarrea en el mundo (*GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators*, 2015). La incidencia y gravedad de la enfermedad está íntimamente asociada a dos factores:

1. Condiciones higiénico-sanitarias: la enfermedad es más frecuente en comunidades con acceso limitado a agua potable y saneamiento inadecuado.
2. Estado inmunitario: la enfermedad es más frecuente en personas inmunodeprimidas.

En áreas desfavorecidas de países de renta baja, la criptosporidiosis es la segunda causa de muerte por diarrea en niños menores de 5 años (Kotloff et al., 2013), afectando sobre todo a aquéllos con déficits nutricionales. En países de renta media y alta con adecuadas condiciones higiénico-sanitarias la enfermedad es raramente mortal, siendo los niños y los pacientes inmunodeprimidos las poblaciones más vulnerables. *Cryptosporidium* spp. es uno de los principales patógenos vinculados a brotes de enfermedad gastrointestinal de transmisión hídrica y alimentaria en el mundo (Zahedi et al., 2020). En Europa, la mayoría de los casos de criptosporidiosis ocurren durante los meses de finales del verano y principios del otoño, estando asociados a desplazamientos vacacionales y uso de aguas recreativas (Cacciò y Chalmers, 2016).

Los casos de criptosporidiosis son de declaración obligatoria en España. Desde el año 2016 y hasta el año 2022 inclusive, se notificaron a la Red Nacional de Vigilancia en Salud Pública (RENAVE) un total de 4 739 casos confirmados, si bien el número real de infecciones es probablemente mayor debido a una infradetección de casos asintomáticos o leves, así como probablemente a una infranotificación de las detecciones en alguna CCAA. En España, en 2023, las incidencias acumuladas más altas se registraron en menores de entre 1 y 4 años, más de 130 y de 85 casos por 100 000 habitantes para niños y niñas respectivamente, reduciéndose a menos de 5 casos por 100 000 habitantes a partir de los 14 años para ambos sexos. (Ministerio de Sanidad. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2023).

Históricamente, el diagnóstico de la criptosporidiosis se ha basado en la identificación por microscopía convencional de las formas transmisibles del parásito (los ooquistes) en heces. Más recientemente, las técnicas de detección rápida (p.e., inmunocromatografía) y las basadas en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) están adquiriendo preponderancia debido a su mayor sensibilidad y coste-efectividad (Dacal et al., 2020). La detección de los ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras ambientales, como en agua, es más compleja y requiere protocolos específicos de concentración, purificación y detección del patógeno (Quintero-Betancourt et al., 2003).

1.2. Agente

El género *Cryptosporidium* está constituido por al menos 46 especies, de las que 24 han sido descritas en humanos (Tabla 1). También se han descrito más de 120 genotipos de carácter taxonómico incierto, de los cuales 3 han sido hallados en humanos (Tabla 1).

La especie antrópica *Cryptosporidium hominis* y la especie zoonósica *C. parvum* causan aproximadamente el 90% de las infecciones humanas caracterizadas globalmente (Ryan et al., 2021). *C. hominis* y *C. parvum* son también las dos especies más comúnmente identificadas en muestras clínicas humanas asociadas a brotes de enfermedad gastrointestinal de origen hídrico (Bourli et al., 2023). Otras especies como *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. felis* o *C. meleagridis* causan infecciones normalmente esporádicas en niños o individuos inmunocomprometidos.

Tabla 1.*Hospedadores, principales y secundarios, de especies y genotipos de Cryptosporidium descritas en el ser humano. Fuente: cortesía David Carmena (adaptado de Fredes Martínez, 2016)*

Especie/genotipo	Hospedador principal[1]	Hospedador secundario	Frecuencia hallada en humanos	Implicado en brotes transmitidos por el agua de consumo[2]
C. andersoni	Bóvidos	–	Esporádica	No
C. baileyi	Aves	–	Esporádica	No
C. bovis	Bóvidos	–	Esporádica	No
C. canis	Perros	Otros cánidos	Esporádica	No
C. cuniculus	Conejos	Liebres	Moderada	Sí
C. ditrichi	Roedores	–	Esporádica	No
C. equi	Caballos	–	Esporádica	No
C. erinacei	Erizos	Caballos	Esporádica	No
C. fayeri	Marsupiales	–	Esporádica	No
C. felis	Gatos	Otros félidos	Esporádica	No
C. hominis	Humanos	Primates no humanos	Muy frecuente	Sí
C. meleagridis	Aves	Humanos	Moderada	No
C. mortiferum	Ardillas	–	Esporádica	No
C. muris	Roedores	–	Esporádica	No
C. occultus	Roedores	Camélidos	Esporádica	No
C. parvum	Rumiantes	Humanos, roedores	Muy frecuente	Sí
C. sciurinum	Hurones	–	Esporádica	No
C. scrofarum	Jabalíes	Cerdos	Esporádica	No

[1] Hospedador: organismo que aloja a un parásito en cualquiera de sus fases evolutivas. Se considera "hospedador principal" aquel organismo en el que es más frecuente la infección y "hospedador secundario" al organismo en el cual el parásito se encuentra con menor frecuencia o, aunque pueda desarrollarse, no es lo habitual.

[2] Organización Mundial de la Salud (2009) y Puleston et al. (2014).

Especie/genotipo	Hospedador principal[1]	Hospedador secundario	Frecuencia hallada en humanos	Implicado en brotes transmitidos por el agua de consumo[2]
C. suis	Cerdos	Jabalíes	Esporádica	No
C. tyzzeri	Roedores	–	Esporádica	No
C. ubiquitum	Rumiantes	Humanos	Moderada	No
C. viatorum	Humanos	Roedores	Moderada	No
C. wrairi	Roedores	–	Esporádica	No
C. xiaoi	Ovejas	Cabras	Esporádica	No
Genotipo ratón III	Roedores	–	Esporádica	No
Genotipo ratón IV	Roedores	–	Esporádica	No
Genotipo mofeta	Mofetas	Mustélidos	Esporádica	No

1.3. Reservorio

Las especies de *Cryptosporidium* difieren en su especificidad y rango de hospedador. Respecto a las de relevancia en salud pública, el principal reservorio de *C. hominis* es el ser humano. Esta especie también ha sido ocasionalmente hallada en el tracto intestinal de primates no humanos y rumiantes domésticos (Widmer et al., 2020). Por su parte, *C. parvum* infecta una gran variedad de mamíferos, siendo el ganado (principalmente terneros y corderos) las fuentes de mayor riesgo de infección humana. Los animales de compañía son reservorios de especies de *Cryptosporidium* potencialmente patogénicas para el hombre, aunque la tasa de eventos de transmisión zoonósica es considerada baja (de Lucio et al., 2017). Los animales salvajes pueden tener relevancia como fuentes de contaminación ambiental con ooquistes infectivos del parásito, suponiendo un riesgo de transmisión para otros animales y, dependiendo de la especie de *Cryptosporidium* circulante, incluso para el hombre.

1.4. Modo de transmisión

Como otros protozoos entéricos, *Cryptosporidium* es un organismo de transmisión fecal-oral. Presenta tres estadios de desarrollo característicos: el ooquiste (fase infectiva), el esporozoíto (fase invasiva) y el trofozoíto (fase replicativa). Es considerado un parásito monoxénico (que cumple su ciclo biológico en un único hospedador) y heterogenético (que combina fases de reproducción asexual y sexual) (Köster et al., 2024a). El mecanismo de transmisión es fecal-oral, de forma directa persona-persona o animal-persona o indirecta, a través del consumo de agua y alimentos contaminados o por hábitos higiénicos (por ejemplo, lavado de manos) deficientes.

La infección con *Cryptosporidium* se inicia cuando un hospedador susceptible ingiere un ooquiste viable, cuyos cuatro esporozoítos son liberados en el intestino delgado (Figura 1 1) donde invaden las células epiteliales formando una vacuola parasitófora intracelular, pero extracitoplasmática. En ellas el parásito se transforma en un trofozoíto (Figura 1 2) que se divide asexualmente formando merontes de tipo I (Figura 1 3). Los merontes tipo I infectan células adyacentes del epitelio intestinal y vuelven a reproducirse asexualmente para generar nuevos merontes tipo I, o bien merontes tipo II (Figura 1 4). Los merontes tipo II forman cuatro merozoítos; cuando éstos infectan nuevos enterocitos comienzan un ciclo de reproducción sexual transformándose en microgametos masculinos y macrogametos femeninos para formar ooquistes de pared gruesa (Pg) y ooquistes de pared delgada (Pd) (Figura 1 5). Los ooquistes de pared gruesa contienen cuatro esporozoítos, son

ambientalmente resistentes y se excretan junto con las heces del hospedador perpetuando el ciclo del parásito. Los ooquistes de Pd son autoinfectivos y contribuyen a mantener la infección durante periodos prolongados.

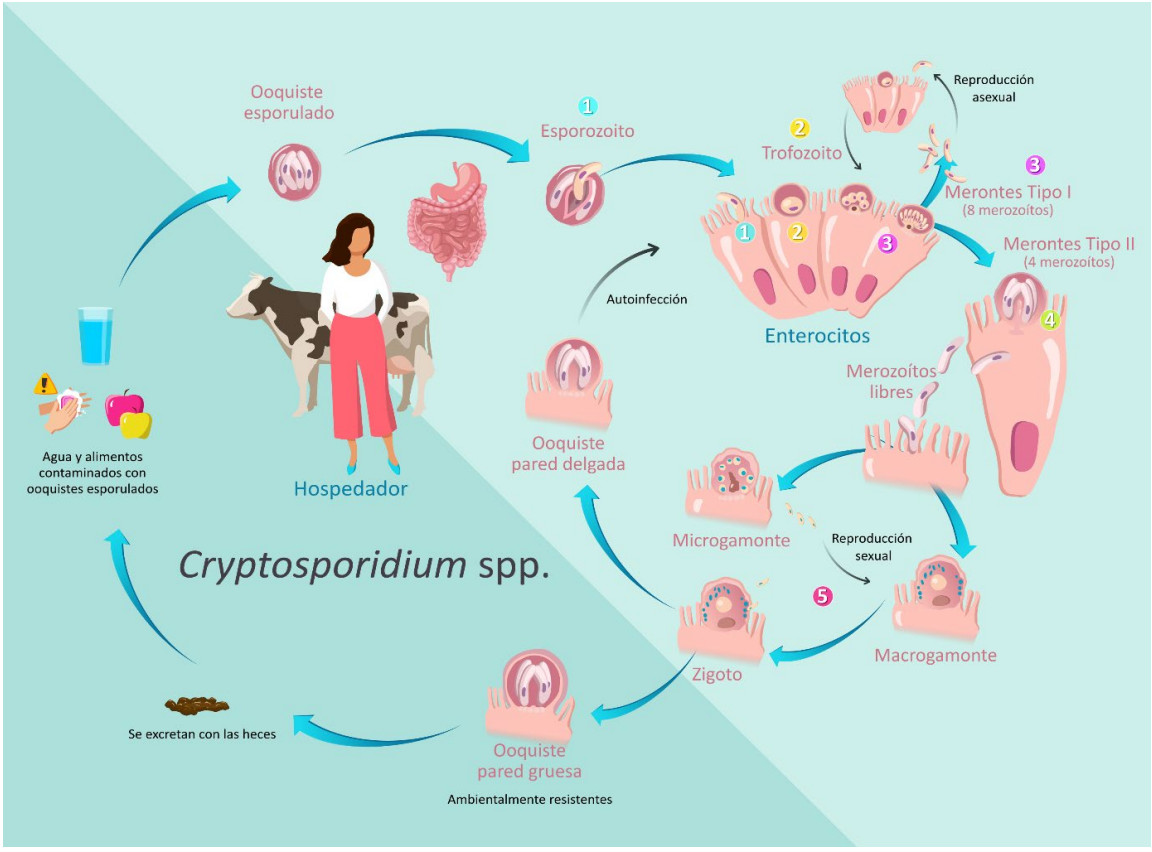


***Figura 1**. Ciclo vital de Cryptosporidium spp. Fuente: Köster et al. (2024b)*

Aunque mucho menos frecuente, la infección del tracto respiratorio también es posible por inhalación de ooquistes del parásito a partir de aerosoles o por contacto con fómites contaminados (Sponseller et al., 2014).

1.5. Patogenicidad

La presencia o ausencia de sintomatología y la gravedad de la infección dependen de factores como la carga parasitaria, la virulencia de la especie/genotipo del parásito, la respuesta inmunológica del hospedador y la interacción con su microbiota intestinal (Köster et al., 2024a). En individuos inmunocompetentes, la criptosporidiosis suele producir gastroenteritis autolimitada con diarrea acuosa, dolor abdominal, vómitos, fiebre, náuseas y pérdida de peso. Estos síntomas suelen durar 2–3 semanas y son resueltos espontáneamente por la respuesta inmunitaria del hospedador. Sin embargo, en algunos pacientes pueden prolongarse durante 4 o más semanas. En pacientes inmunocomprometidos [Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) +, receptores de trasplante de órgano sólido, inmunodeficiencia de células T, neoplasias hematológicas malignas] la criptosporidiosis suele manifestarse como una diarrea severa y crónica que incrementa la morbilidad y mortalidad en esos pacientes de alto riesgo. Además, han sido descritas complicaciones extraintestinales con afectación del tracto biliar, como pancreatitis, colangitis esclerosante y colecistitis acalculosa. La criptosporidiosis pulmonar es rara, pero puede presentarse con síntomas de tos y disnea en pacientes VIH+ (Köster et al., 2024b).

1.6. Control

No existe en la actualidad ninguna vacuna disponible contra la criptosporidiosis. La nitazoxanida es el único medicamento actualmente aprobado para el tratamiento de la enfermedad, pero solo en individuos inmunocompetentes mayores de un año (Rossignol, 2010). Además, su efectividad es limitada en pacientes inmunocomprometidos [por ejemplo, pacientes con Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)].

Las medidas recomendadas para minimizar el riesgo de infección por *Cryptosporidium* deben ir dirigidas a la implementación de medidas de higiene personal adecuadas, y a evitar el consumo de agua no tratada o alimentos frescos incorrectamente procesados y el contacto con materia fecal de origen humano o animal, incluyendo:

- El lavado de manos frecuente, sobre todo antes de ingerir alimentos y después de defecar.
- Evitar ingerir agua durante el uso de piscinas o parques acuáticos.
- En caso de padecer diarrea, evitar el baño en piscinas y en aguas de baño.
- Asegurarse de que los niños de corta edad estén limpios antes de meterse en el agua.
- Evitar beber agua no tratada proveniente de arroyos, ríos, lagos y pantanos.
- Extremar las medidas de higiene personal, incluyendo el lavado de manos, después del contacto con animales de granja y mascotas o con sus heces.
- Evitar beber productos de origen animal o vegetal no pasteurizados o sin el control sanitario adecuado.
- Extremar las precauciones en viajes a países endémicos con agua de consumo y saneamiento deficientes, evitando el consumo de agua de grifo, hielo y alimentos frescos no procesados, en particular verduras y hortalizas.
- Reducir la exposición fecal-oral durante la realización de prácticas sexuales, particularmente si están involucradas personas con diarrea.

1.7. Factores que facilitan la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en el ambiente

Hay toda una serie de factores biológicos, ambientales, climáticos, hidrográficos y comunitarios implicados en la presencia de *Cryptosporidium* en el medio ambiente una vez éste ha sido contaminado a partir del reservorio humano o animal, que deben ser considerados a la hora de evaluar su relevancia en salud pública en un abastecimiento (Carmena, 2010).

Entre los factores biológicos de relevancia, se incluyen la tasa de excreción de *Cryptosporidium* desde un hospedador infectado, la estabilidad y resistencia de los ooquistes en el ambiente, su alta infectividad para un hospedador susceptible y su potencial *zoonósico* (es decir, su capacidad de transmisión entre un animal y el hombre y viceversa).

La excreción de ooquistes en un hospedador competente en el pico de la infección es extremadamente elevada (rango: 10^6–10^{11} ooquistes/g de heces) y prolongada en el tiempo (semanas). Los individuos jóvenes (por ejemplo, terneros < 1 mes, niños < 4 años) son los más vulnerables a la infección y a sus consecuencias (diarrea).

Por este motivo, el ganado puede contribuir en gran medida a la contaminación ambiental (incluyendo aguas superficiales para consumo humano) con ooquistes infectivos del parásito si sus excretas no son manejadas correctamente (Rose, 2002). La misma afirmación es extrapolable a las aguas residuales humanas no tratadas convenientemente. Los individuos adultos pueden actuar ocasionalmente como portadores asintomáticos de la infección, pero tienen importancia epidemiológica como diseminadores de ooquistes capaces de infectar a individuos jóvenes y perpetuar el ciclo de transmisión del parásito.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* son extremadamente resistentes a las condiciones medioambientales adversas, pudiendo mantener su viabilidad durante meses en el medio acuático (Robertson et al., 1992; Chauret et al., 1995; Medema et al., 1997). Los ooquistes también pueden sobrevivir en aguas de estuario hasta 12 semanas a 20 °C y una salinidad de 10 partes por millón (ppm), reduciendo su viabilidad a 4 semanas en agua de mar con una salinidad de 30 ppm (Fayer et al., 1998).

Con respecto a la dosis mínima infectante se ha visto que puede ser de 1 a 30 ooquistes (Fredes Martínez, 2016). Este hecho contribuye a la propagación de la enfermedad incluso en escenarios epidemiológicos con bajos niveles de contaminación ambiental.

La procedencia del agua del abastecimiento y las actividades agrícolas y ganaderas próximas a las cuencas hídricas constituyen un factor ambiental a tener en cuenta. Por ejemplo, las actividades agrícolas en las que se aportan heces de animales muestran que los cursos hídricos que reciben descargas de aguas residuales o escorrentías de ganado tienen concentraciones de ooquistes de 10 a 100 veces superiores que las zonas sin dicha actividad (LeChevallier et al., 1991; Rose et al, 1991).

La presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en aguas superficiales ha sido estimada en el rango de 4–100 % de las muestras examinadas, con concentraciones que oscilan entre 0,1–10 000 ooquistes/L, dependiendo del impacto de aguas residuales no tratadas y de la actividad ganadera en la zona. Debido a su mayor exposición, las aguas superficiales son más vulnerables a la contaminación. Sin embargo, algunos estudios han encontrado que el agua subterránea, que se pensaba que era una fuente más protegida frente a la contaminación por este protozoo, mostraba porcentajes de positividad frente a *Cryptosporidium* entre el 9,5 y el 22% de las muestras analizadas, aunque en bajas concentraciones (Hancock et al., 1997; Rose, 2002).

Entre los factores climáticos que pueden afectar a la presencia de *Cryptosporidium* en el agua de consumo se incluyen la temperatura (las temperaturas más bajas favorecen la supervivencia de los ooquistes con capacidad infectiva) y la frecuencia e intensidad de precipitaciones (las escorrentías causadas por lluvias torrenciales pueden incrementar la concentración de ooquistes en cursos hídricos en zonas con una alta actividad agrícola y ganadera).

De forma general, la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en el agua de consumo supone un riesgo de salud pública cuando:

- **Son viables**. No todos los ooquistes presentes en la matriz acuática contienen esporozoítos infectivos.
- **Son infectivos**. No todos los ooquistes esporulados son capaces de causar infección en un hospedador competente.
- **Pertenecen a una especie infectiva para el ser humano**. Solo un número relativamente limitado de especies de *Cryptosporidium* (principalmente *C. hominis* y *C. parvum*) son capaces de infectar al hombre consistentemente. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios moleculares periódicos para conocer la frecuencia y diversidad de especies en las cuencas hídricas usadas como fuente de abastecimiento para uso humano.
- **Se encuentran en concentraciones suficientes para causar infección**.

2. Presencia de Cryptosporidium en agua

2.1. Presencia de *Cryptosporidium* en el agua de consumo.

2.2. Caracterización de brotes de criptosporidiosis en agua de consumo publicados en la literatura.

2.3. Caracterización de brotes de criptosporidiosis en piscinas e instalaciones de uso recreativo descritos en la literatura.

A la hora de estudiar el origen de los brotes de criptosporidiosis de transmisión hídrica en nuestro país, hay dos perfiles claramente diferenciados. Una gran proporción de los casos están relacionados con el baño en piscinas y aguas recreativas. Por otro lado, se han identificado brotes (alguno de gran magnitud) relacionados con el consumo de agua de la red de abastecimiento [Ministerio de Sanidad. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES), 2023; Peñuelas Martínez et al., 2024]. El origen de la contaminación por *Cryptosporidium* y otras circunstancias que intervienen en la aparición de los brotes, como factores ambientales, no necesariamente guardan relación, por lo que conviene estudiarlas por separado.

2.1. Presencia de *Cryptosporidium* en el agua de consumo

El estudio de los brotes relacionados con el agua de consumo en el pasado -ver más adelante algunos ejemplos publicados en la literatura- ha puesto de manifiesto que en muchos de estos brotes los sistemas de tratamiento también pueden ser vulnerables cuando los procedimientos de coagulación y filtración no operan ni se mantienen correctamente. En el caso del agua de consumo que procede de abastecimientos dotados con Estación de Tratamiento de Agua Potable (ETAP), uno de los posibles motivos de la presencia de ooquistes en el agua de salida de esta es la recirculación repetida del agua de lavado de los filtros en la cabecera de la ETAP. Esta situación hace que se acumulen cantidades crecientes de ooquistes en los filtros de arena, llegando a colmatarlos y convirtiéndolos en emisores de *Cryptosporidium,* en vez de una barrera de contención de estos.

El riesgo de aparición de brotes a nivel local relacionados con el consumo de agua de la red de abastecimiento estará influenciado por la capacidad que tengan las plantas de tratamiento de agua para hacer frente a eventos meteorológicos extremos (por ejemplo, lluvias torrenciales) y su correcto mantenimiento y funcionamiento en estas condiciones inusuales. A pesar de que el agua de consumo de la red de abastecimiento en España es de una alta calidad, la resiliencia de las ETAP a condiciones ambientales adversas es una cuestión prioritaria, ya que se prevé que el cambio climático aumente la frecuencia de eventos extremos relacionados con precipitaciones, sequía y temperatura.

En general, el tratamiento de elección para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium* en agua de consumo es la ozonización, aunque también puede ser útil la radiación ultravioleta (UV). Es importante tener en cuenta que estos procedimientos no eliminan físicamente los ooquistes del parásito de la matriz acuática, por lo que pueden seguir siendo detectados (aunque inactivos y no infectivos) en muestras postratamiento.

El riesgo de brotes de transmisión hídrica en zonas de abastecimiento sin ETAP, normalmente en núcleos urbanos más pequeños o zonas rurales, se considera mayor, especialmente si el tratamiento del agua es únicamente con derivados del cloro, ya que éstos no inactivan, a las concentraciones y tiempos de exposición habituales, los ooquistes de *Cryptosporidium*. El pequeño tamaño de los ooquistes de *Cryptosporidium* (4–6 micras de diámetro) tampoco facilita su eliminación en los procesos de filtración de manera consistente (Rose, 2002). Sin embargo, a pesar de que el pequeño tamaño de los ooquistes dificulte su eliminación del agua, ésta es posible gracias a la aplicación de diferentes tratamientos previos (los cuales se detallan en secciones posteriores de la guía), entre los que cabe mencionar la coagulación-floculación y los distintos tipos de filtración.

Parámetros como la turbidez del agua del abastecimiento y la presencia de otros patógenos como *Clostridium perfringens* (incluidas sus esporas) han sido propuestos como indicadores de la posible presencia de *Cryptosporidium* spp. en el agua (valor paramétrico de 0 Unidades formadoras de colonias (UFC)/ 100 mL, en la salida de la ETAP o depósito de cabecera). Según la legislación vigente, "cuando la determinación de *Clostridium perfringens* sea positiva y exista una turbidez mayor de 4 Unidades nefelométricas (UNF) se determinarán, en la salida de la ETAP o depósito de cabecera, *Cryptosporidium* u otros microorganismos o parásitos que señale la autoridad sanitaria" (Real Decreto 3/2023, de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro. BOE núm. 9 de 11/01/2023, 2023).

2.2. Caracterización de brotes de criptosporidiosis en agua de consumo publicados en la literatura

La contaminación de aguas destinadas a la producción de agua para consumo humano con material fecal de ganado bovino o humano, asociada con brotes de diarrea causados por este parásito, está bien documentada en la literatura a nivel mundial desde hace tiempo. De hecho, algunos estudios han mostrado como algo frecuente encontrar ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas para consumo humano.

Los factores implicados en el origen de brotes de criptosporidiosis de transmisión hídrica, de forma individual o combinada se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. *Algunos brotes de criptosporidiosis por agua de consumo en los que se estudió el origen de la presencia del parásito en el agua de consumo (adaptado de Organización Mundial de la Salud, 2009) y otros reportados en bibliografía más reciente*

Origen documentado [1]	Localización	Año	Nº de casos / brotes	Referencia	Comentario
Por contaminación de la fuente de agua debido a fuertes lluvias o nieve derretida	Wiltshire, Oxfordshire, Reino Unido	1991	516 casos confirmados	Richardson et al. (1991)	Agua tratada por métodos convencionales (coagulación/filtración y desinfección). Posiblemente ligado a la recirculación del agua de retrolavado del filtro, entre otros factores
	Milwaukee, Wisconsin, E.E. U.U.	1994	403 000 casos estimados	Mac Kenzie et al. (1994)	Causado por heces de ganado en aguas superficiales que pasaban por la planta de tratamiento convencional justo después de un cambio de coagulante
	E.E. U.U. (todo el país)	1948–1994	548 brotes comunicados	Curriero et al. (2001)	
Por contaminación de pozos con aguas residuales	Texas, E.E. U.U.	1984		D'Antonio et al. (1985)	La fuente de agua era un pozo artesiano y se sospechaba que estaba contaminada con aguas residuales. La desinfección por cloración fue el único tratamiento
	E.E. U.U. (17 estados de todo el país)	1993–1994	Datos de 30 brotes comunicados	Kramer et at. (1996)	
Por prácticas de tratamiento inadecuadas	Wiltshire, Oxfordshire, Reino Unido	1991	516 casos confirmados	Richardson et al. (1991)	Ver más arriba

Origen documentado [1]	Localización	Año	Nº de casos / brotes	Referencia	Comentario
	Canadá	1993–1996	35 brotes comunicados	Craun et al. (1998)	
	E.E. U.U.	1984–1994			
	Reino Unido	1986–1995			
Por deficiencias en el tratamiento	Reino Unido	1989	9 000 casos comunicados	Badenoch (1990)	Informe encargado por el Parlamento Británico a un grupo de expertos con motivo del importante aumento de casos de criptosporidiosis ocurrido el año anterior y las implicaciones en el abastecimiento de agua de consumo
	Talen, Oregon, E.E. U.U.	1992	43 casos confirmados	Leland et al. (1993)	Deficiencias mecánicas y operativas en una de las plantas de filtración de agua de la pequeña ciudad de Talen (6.000 hab.) junto con condiciones inusualmente deficientes del suministro de agua debido a los bajos caudales de los arroyos
	Canadá	1993–1996	35 brotes comunicados	Craun et al. (1998)	
	E.E. U.U.	1984–1994			
	Reino Unido	1986–1995			
Por fugas o conexiones cruzadas en el sistema de distribución	Canadá	1993–1996	35 brotes comunicados	Craun et al. (1998)	
	E.E. U.U.	1984–1994			
	Reino Unido	1986–1995			
Por combinaciones de alguno de los anteriores	Milwaukee, Wisconsin, E.E. U.U.	1994	403 000 casos estimados	Mac Kenzie et al. (1994)	Ver más arriba.
Sistema de suministro de agua potable	Suecia	2010	Aproximada mente 27 000 casos	Widerström et al. (2014)	Sospecha como causa la contaminación de las aguas superficiales por aguas residuales humanas y un posterior déficit en el tratamiento en la planta de tratamiento de agua (cloraminación y ozonización), a pesar de cumplir con las normas suecas sobre el tratamiento de agua destinada a agua de consumo. La solución a largo plazo para reducir los parásitos fue la instalación de un sistema de desinfección del agua de radiación UV.
Sistema de suministro de agua	Irlanda	2012	12 casos	Mahon y Doyle (2017)	Sospecha como causa un fallo en la planta de tratamiento de agua.
Sistema de suministro de agua potable	Reino Unido	2013	23 casos confirmados	Chalmers et al. (2019)	
Sistema de suministro de agua potable	Oregon (Estados Unidos)	2013	119 casos	Benedict et al. (2017)	Origen: lago/embalse/presa. El sistema de suministro de agua es de tipo comunitario (sistema público de agua que sirve a las personas residentes de una comunidad, zona residencial o parque de casas móviles durante todo el año)
Sistema individual de agua potable	Virginia (Estados Unidos)	2013	19 casos	Benedict et al. (2017)	Origen: pozo. Entorno agrícola/granja. Los sistemas de agua individuales son sistemas pequeños que no son propiedad ni están gestionados por una empresa de servicios públicos de agua y que tiene menos de 15 conexiones o sirve a menos de 25 personas.
Sistema	Ohio (Estados	2014	100 casos	Benedict et al.	Origen: río/arroyo. Entorno agrícola/granja.

Origen documentado [1]	Localización	Año	Nº de casos / brotes	Referencia	Comentario
individual de agua potable	Unidos)			(2017)	*Cryptosporidium* spp. fue detectado en las muestras de agua, pero no se detectó en ninguna muestra clínica.
Sistema de suministro de agua potable	Francia	2017	2 brotes sucesivos, (100 casos en total)	Watier-Grillot et al. (2022)	Toda la red estaba contaminada con *Cryptosporidium* spp., encontrándose el nivel más alto en las aguas subterráneas y en el agua que sale de la planta de tratamiento. Se identificaron diversas actividades contaminantes dentro de los perímetros de protección del recurso hídrico. Se instaló una unidad de ultrafiltración a la salida de la planta de tratamiento de agua y algunas semanas después, no se encontraron quistes de *Cryptosporidium* en el sistema de suministro público de agua potable.
Sistema de suministro de agua potable	Italia	2019	80 casos	Franceschelli et al. (2022)	Sistema de suministro que utiliza agua de manantial que recibió un tratamiento de desinfección insuficiente para inactivar el parásito. El sistema de suministro se abastece de varios manantiales. Se sospecha que el origen de la contaminación podría estar en ellos, aunque se necesitarían más investigaciones para saberlo con certeza. Uno de los manantiales estaba cerca de una zona agrícola y otro de ellos se encontraba en mal estado, sin zona de protección y con agua estancada en la captación y riesgo de escorrentía.
Sistema de suministro de agua potable	España	2023	539 casos (69 casos confirmados)	Peñuelas Martínez et al. (2024)	

[1]En ocasiones, en el estudio se refleja una combinación de factores como origen del brote (por ejemplo, lluvias torrenciales y unas prácticas inadecuadas de tratamiento).

2.3. Caracterización de brotes de criptosporidiosis en piscinas e instalaciones de uso recreativo descritos en la literatura

Los factores implicados en el origen de brotes de criptosporidiosis de transmisión hídrica en piscinas e instalaciones de uso recreativo se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. *Brotes de criptosporidiosis en piscinas e instalaciones de uso recreativo*

Instalación	Problema detectado u origen del *Cryptosporidium*	Localización	Año	Nº de casos	Referencia	Comentario
Piscina	**Por contaminación del agua de la piscina sin documentar origen del problema**	Mallorca, Baleares, España	2003	391 casos (214 positivos para *Cryptosporidium*). Todos ellos huéspedes	Galmes et al. (2003)	No se encontraron fallos en la infraestructura de suministro de agua al hotel. Se encontraron ooquistes de *Cryptosporidium* en el agua de la piscina. La piscina se cerró, vació y desinfectó. Se cambiaron los filtros. Posteriormente, las autoridades autorizaron su llenado y reapertura.

Instalación	Problema detectado u origen del *Cryptosporidium*	Localización	Año	Nº de casos	Referencia	Comentario
				alojados en el hotel.		
Piscina	**Accidente fecal**	Ohio, E.E. U.U.	2000	Más de 700 casos con clínica	Mathieu et al. (2000)	Accidentes fecales documentados. Los registros indicaban que la piscina cumplía con las regulaciones sanitarias locales. El estudio de casos y controles para investigar los factores de riesgo relacionados encuentra que la ingesta de agua de la piscina fue el factor de riesgo más importante (OR 5.1; IC al 95%: 2,1-12.5).
Piscina	**Accidente fecal**	Surrey, Canadá	2004	33 casos	Louie et al. (2004)	El sistema de tratamiento de agua de cada una de las piscinas utilizaba filtros de arena, ozonización y cloración y todos se encontraban operativos durante el periodo estimado de exposición. Habían ocurrido dos accidentes fecales durante el periodo de exposición.
Piscina	**Sin accidente fecal y piscina con un buen mantenimiento**	Colorado, E.E. U.U.	2009	21 casos	Boehmer et al. (2009)	Brote relacionado con la celebración de una fiesta en una piscina. En el estudio de cohortes realizado, 21 de los 37 asistentes a la fiesta (57%) desarrollaron la enfermedad. La piscina cumplía los estándares de cloración de las guías y de manera adicional utilizaba radiación con luz UV. No se reportó accidente fecal. Los autores del estudio lo consideran un ejemplo de un brote de criptosporidiosis en una piscina comunitaria con buen mantenimiento.
Piscina	**Identificados fallos en el tratamiento y manejo del agua de piscinas**	Inglaterra	2016	22 casos	Bagnall et al. (2021)	
Parque acuático	**Fallo en el sistema o métodos de desinfección**	Niágara, Canadá	2010	12 casos	Hopkins et al. (2013)	Sistema de desinfección con UV no operativo coincidiendo con un episodio de ensuciamiento del agua.
Parque acuático	**Fallos en los procedimientos y mantenimiento**	California, E.E. U.U.	2004	Más de 250 casos	Wheeler et al. (2004)	Las PCR realizadas identifican *C. parvum* subtipo IIc, subtipo

Instalación	Problema detectado u origen del *Cryptosporidium*	Localización	Año	Nº de casos	Referencia	Comentario
						antroponótico, es decir, adaptado al ser humano La mayoría de los vigilantes estuvieron enfermos antes que los clientes y admitieron haber estado en el agua con síntomas, lo que demuestra que la contaminación del agua por personal enfermo puede haber contribuido a la aparición del brote. Aunque no se documentaron accidentes fecales, se sabe que es fácil que ocurran y que pueden pasar sin ser detectados debido a las características de la diarrea acuosa por *Cryptosporidium*. Las inspecciones realizadas descubrieron un inadecuado mantenimiento de los registros de la calidad del agua con fallos en los procedimientos y en el mantenimiento. El parque se cerró voluntariamente en la temporada 2004 reabriéndose al año siguiente tras cumplir con el conjunto de medidas incluida hipercloración semanal de todas las atracciones acuáticas.
Fuente transitable	**Contaminación del agua**	Barcelona	2018	71 casos	Agencia de Salud Pública de Barcelona, 2018	El brote fue vinculado a una fuente ornamental transitable situada en el barrio de Sant Andreu, Barcelona. El brote afectó a 71 personas con una media de edad de 7 años. En la investigación ambiental se evidenció la no aptitud del agua de la fuente para el baño, atendida la elevada turbidez (>5 UNF) y una desinfección inadecuada (valores de cloro libre residual oscilantes y cloro libre combinado >0,6 ppm). Los resultados de las muestras de agua analizadas confirmaron la contaminación fecal del agua de la fuente por la presencia de microorganismos aerobios (>3 000 UFC/L) al 100% de las muestras recogidas, presencia de coliformes (desde presencia hasta 200 NMP/100 mL al 75% de las muestras), presencia de *Clostridium perfringens* (50% muestras) y presencia de *Pseudomonas aerugionsa* (50-200 UFC/100 mL, 100% muestras).

Instalación	Problema detectado u origen del *Cryptosporidium*	Localización	Año	Nº de casos	Referencia	Comentario
						Además, estudios complementarios de una muestra confirmaron también la presencia de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia*.

3. Presencia de Cryptosporidium en abastecimientos con ETAP

3.1. Consideraciones generales sobre las diferentes etapas de tratamiento realizado en una ETAP

3.1.1. La captación y la fase de pretratamiento

3.1.2. Fase de coagulación-floculación

3.1.3. Fase de filtración

3.1.4. Fase de desinfección

3.2. Medidas preventivas

3.2.1. Fase de captación y pretratamiento

3.2.2. Fase de coagulación-floculación

3.2.3. Fase de filtración

3.2.4. Fase de desinfección

3.3. Medidas correctoras ante diferentes escenarios posibles

Escenario 1: Detección de *Cryptosporidium* en agua de abastecimiento sin brote de gastroenteritis aguda (GEA)

Escenario 2: Detección de *Cryptosporidium* en agua de abastecimiento con brote de GEA y sin confirmación de *Cryptosporidium* por examen de heces como el agente causal

Escenario 3a: Brote de GEA en la comunidad con confirmación de *Cryptosporidium* en el examen de heces como agente causal y con presencia de *Cryptosporidium* en el agua del abastecimiento

Escenario 3b: Brote de GEA en la comunidad con/sin confirmación de *Cryptosporidium* como agente causal (coprocultivo) y sin estudio previo de la presencia de *Cryptosporidium* en el agua de abastecimiento

Una ETAP es el conjunto de procesos unitarios de tratamiento de potabilización, situados antes de la red de distribución y/o del depósito de cabecera, y que además contenga más procesos unitarios de tratamiento que la filtración y desinfección, incluidas las desalinizadoras y las plantas de tratamiento de abastecimientos propios no conectados a la red de distribución pública (Real Decreto 3/2023, de 10 de enero).

El objetivo de una ETAP es el tratamiento del agua bruta captada de los embalses y otras fuentes de aguas superficiales y subterráneas para que sea apta para consumo humano, es decir, para convertirla en agua potable. En una zona de abastecimiento, las ETAP se localizan entre la captación de agua y los depósitos y redes de distribución que la suministran a los usuarios.

3.1. Consideraciones generales sobre las diferentes etapas de tratamiento realizado en una ETAP

3.1.1. La captación y la fase de pretratamiento

Agua de captación son las aguas de las zonas protegidas en las masas de agua que vayan a ser destinadas a la producción de agua de consumo, independientemente del tratamiento requerido. La masa de agua es la unidad de gestión efectivamente identificada y delimitada en los planes hidrológicos de cuenca en vigor. Estas masas pueden ser:

- Masa de agua superficial (lago, laguna, embalse, corriente, río o canal, parte de una corriente, río o canal, aguas de transición o aguas costeras).
- Masa de agua subterránea en un acuífero o acuíferos (pozo excavado, pozo entibado, manantial, galería de filtración).

La masa de agua superficial es más habitual para abastecer zonas urbanas -dado el gran volumen de agua que requieren- y la masa de agua subterránea es más habitual en zonas rurales. Ambas pueden actuar como agua de captación de una ETAP.

Hay algunos aspectos de las diferentes modalidades de aguas de captación que pueden tener influencia en la presencia de *Cryptosporidium* en el agua de abastecimiento de la ETAP.

Se ha comprobado que las concentraciones de ooquistes de *Cryptosporidium* más elevadas se encuentran más frecuentemente en aguas de zonas urbanas o agrícolas que en aguas de zonas sin influencia de actividad humana (LeChevallier et al., 1991; Rose et al, 1991).

El 12% de los suministros de agua subterránea en EE. UU. estaban contaminados con *Cryptosporidium* o *Giardia* (Hancock et al., 1997), principalmente en galerías de infiltración y pozos horizontales (afectados por la contaminación del agua superficial).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* pueden mantener su infectividad durante meses en aguas superficiales (Robertson et al., 1992; Chauret et al., 1995; Medema et al., 1997).

En condiciones naturales, la tasa de reducción de la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* en agua es de 0,005 a 0,037 unidades logarítmicas por día. Los ooquistes también sobreviven bien en aguas de estuario (más de 12 semanas a 20 °C y una salinidad de 10 ppm), pero menos en agua de mar (4 semanas a una salinidad de 30 ppm) (Fayer et al., 1998).

Cryptosporidium se encuentra presente en la mayoría de las aguas superficiales. El nivel de concentración está normalmente relacionado con la presencia en la cuenca de fuentes de contaminación fecal, especialmente aguas residuales de origen humano y escorrentías de tierras agrícolas con estiércol de ganado vacuno u ovino.

Diferentes eventos meteorológicos (tormentas, deshielo) pueden provocar escorrentías de las tierras agrícolas y desbordamiento de los sistemas de alcantarillado. Esto da lugar a un aumento repentino y brusco de la contaminación de las aguas superficiales con materia fecal de origen humano y animal. Varios autores han demostrado que durante estos eventos la concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* puede ser entre 10 y 100 veces mayor que la detectada en condiciones normales (Atherholt et al., 1998; Ferguson et al., 1996; Kistemann et al., 2002). Las precipitaciones torrenciales o los deshielos pueden no solo provocar un aumento de la escorrentía, sino también un desplazamiento rápido de los ooquistes desde la fuente hasta el agua potable o los pozos de agua subterránea (Cox et al., 2004; Medema y Stuyfzand, 2003).

La posible ocurrencia de eventos pico (altas concentraciones de ooquistes en la matriz acuática durante periodos de tiempo breves) debe tenerse en cuenta en el estudio sanitario y la estimación de los niveles de *Cryptosporidium* según el uso de la cuenca. Este fenómeno también es importante a la hora de ejecutar los muestreos de campo, que deben ser realizados tan pronto como se confirme la presencia en el agua de concentraciones inusuales de ooquistes del parásito. Para este fin, el uso de una metodología de muestreo adecuada es esencial para garantizar que las estimaciones realizadas son correctas.

El pretratamiento de aguas brutas comprende un cierto número de operaciones físicas o mecánicas que tiene por objeto separar del agua la mayor cantidad posible de materias, que, por su naturaleza o tamaño, crearían problemas en etapas posteriores. Entre ellas podemos destacar el desbaste, el desarenado y la predecantación (Degremont, 1979). Ninguna de estas etapas, por su propia naturaleza, funciones y características, influye en la reducción/eliminación de los ooquistes de *Cryptosporidium.*

Con carácter general, se dispondrán las medidas para prevenir o reducir los efectos de las contaminaciones accidentales causadas por la industria, por instalaciones ganaderas, por los tanques de aguas pluviales de las depuradoras urbanas y otras.

3.1.2. Fase de coagulación-floculación

Los sistemas de tratamiento convencionales también pueden ser vulnerables a concentraciones inusualmente altas de ooquistes de *Cryptosporidium* cuando los sistemas de coagulación y filtración no se operan y mantienen cuidadosamente (Craun et al., 1998). El tratamiento convencional a gran escala con coagulación, eliminación de flóculos y filtración granular rápida consigue reducciones de la concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* de >2,3 log (LeChevallier y Norton, 1992).

La coagulación consiste en añadir al agua un producto (coagulante) capaz de neutralizar la carga de los coloides presentes en la misma y formar un precipitado. A este proceso le sigue la floculación, procedimiento por el cual se aglutinan las sustancias coloidales presentes, facilitando su decantación y posterior filtrado (Degremont, 1979).

La coagulación y filtración constituyen, por lo tanto, operaciones críticas para lograr la eliminación física de los ooquistes de *Cryptosporidium* (Huck et al., 2002; Abramovich et al., 2004).

Las sales a base de aluminio o hierro (cloruro férrico) o los polímeros orgánicos son los productos químicos coagulantes más comúnmente utilizados en el tratamiento del agua. El enrejado de precipitados es el sistema que consiste en hacer pasar el agua por rejas con aberturas de diferentes diámetros para la eliminación de flóculos. Este sistema se considera el mecanismo óptimo de coagulación para la eliminación de quistes/ooquistes de protozoos en sistemas de tratamiento de agua (Jakubowski y Craun, 2002; Butkus et al., 2003).

La coagulación mejorada se define como el proceso por el cual se obtiene una mejor eliminación de los precursores de desinfectantes y subproductos de la desinfección mediante un tratamiento convencional modificado que incluye la reducción del pH a 5–6 y el uso de dosis más altas de coagulantes (States et al., 2002).

La flotación por aire disuelto (DAF, siglas del inglés *Dissolved Air Flotation*) es un proceso de clarificación alternativo a la sedimentación que permite la eliminación de partículas de flóculos frágiles que se encuentran en el agua mediante la adherencia a burbujas de aire (Braghetta et al., 1997; Edzwald et al., 2000; French et al., 2000). Los estudios a escala en laboratorios y plantas piloto han demostrado que el DAF es mucho más eficaz que la sedimentación para la eliminación de quistes/ooquistes de protozoos (Plummer et al., 1995; Edzwald y Kelley, 1998; Edzwall et al., 2000).

Plummer et al. (1995) demostraron que la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* era más eficiente a un pH de 5 cuando se utilizaron dosis de coagulante superiores a las que se aplican actualmente para disminuir la turbidez.

La filtración combinada con una coagulación, floculación y clarificación eficaces se puede utilizar como barrera para *Cryptosporidium* y otros protozoos patógenos. En muchos casos, la clarificación y filtración asistidas por coagulación pueden ser la única barrera de tratamiento existente contra estos microorganismos (*Australian Drinking Water Guidelines 6*, 2011 Version 3.8 Updated September 2022).

3.1.3. Fase de filtración

La fase de filtración constituye un punto de control crítico (PCC), dentro del proceso de potabilización del agua, para el riesgo de *Cryptosporidium* (*Australian Drinking Water Guidelines 6*, 2011 Version 3.8 Updated September 2022).

Como se comentó en apartados anteriores, en el caso del agua de consumo que procede de abastecimientos con ETAP, y una vez que el agua llega a la planta de tratamiento, uno de los posibles motivos de la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en el agua de consumo a la salida de esta es la recirculación repetida del agua de lavado de los filtros a la cabecera de la ETAP. Esta situación hace que se acumulen cantidades crecientes de ooquistes en los filtros de arena, llegando a colmatarlos y convirtiéndolos en emisores de *Cryptosporidium* en vez de actuar como una barrera de contención de estos.

La eliminación física de los ooquistes de *Crytosporidium* y otros protozoos como *Giardia* se logra, en última instancia, mediante filtros convencionales correctamente operados, siempre que se aplique un pretratamiento eficaz del agua (Betancourt, 2004). Los filtros, dentro de un proceso de tratamiento de agua convencional, se consideran la última barrera para prevenir la entrada de quistes/ooquistes de protozoos al sistema de distribución de agua (Cornwell et al., 2003).

Las ETAP que utilizan carbón activo granulado (CAG) y filtros rápidos de arena tienen una mayor probabilidad de producir efluentes en los que se detecten quistes/ooquistes que aquellas plantas que utilizan filtros de medios duales o mixtos (LeChevallier et al., 1991).

La aplicación de recubrimientos electropositivos a medios de filtración granulares proporciona una mejora de 2,9 veces en el coeficiente de filtración para la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium*. El aumento de la eliminación se atribuyó al cambio en el potencial zeta (de electronegativo a electropositivo) resultante del recubrimiento, que disminuyó la repulsión electrostática entre la arena y los ooquistes electronegativos de *Cryptosporidium* (Shaw et al., 2000).

Se ha demostrado que la filtración con tierra de diatomeas es más efectiva que otros medios de filtración convencionales o granulares para reducir las concentraciones de quistes/ooquistes de *Cryptosporidium* y otros protozoos como *Giardia* (Schuler y Ghosh, 1990; Ongerth y Hutton, 1997, 2001).

Por otra parte, las tecnologías de filtración por membranas, como la microfiltración y la ultrafiltración, son capaces de eliminar los quistes/ooquistes de protozoos de interés si los componentes del sistema asociados están intactos y funcionan correctamente, proporcionando eliminaciones logarítmicas de quistes/ooquistes que oscilan entre más de 4 log y 6 log (Jacangelo et al., 1995, 1997).

Así, los sistemas de filtración directa y de filtración convencional obtienen reducciones logarítmicas de ooquistes de *Cryptosporidium* de 2 log, mientras que los sistemas de filtración por membranas consiguen reducciones > 4 log (*Australian Drinking Water Guidelines 6*, 2011 Version 3.8 Updated September 2022).

En zonas en las que el agua es captada de fuentes con riesgo significativo de contaminación por protozoos patógenos, el objetivo de turbidez tras filtración de <0,2 UNF, por sí solo, puede no reducir el riesgo a niveles aceptables. Pueden requerirse otros tratamientos complementarios, como la filtración por membrana, la desinfección por radiación UV o por ozonización (*Australian Drinking Water Guidelines 6*, 2011 Version 3.8 Updated September 2022).

3.1.4. Fase de desinfección

La desinfección del agua de consumo es el proceso por el cual se inactivan o destruyen los microorganismos patógenos que pudieran estar presentes, de forma que no produzca infección. El proceso de desinfección del agua no ocurre de forma instantánea, sino que requiere un tiempo, y la velocidad a la que transcurre está influenciado por factores como:

i. La concentración del desinfectante.
ii. El tiempo de exposición al desinfectante.
iii. El pH y la temperatura del agua.

La inactivación de los microorganismos sometidos, en condiciones ideales, a un desinfectante, suele seguir una tasa de inactivación que viene dada por la Ley de Chick-Watson, que establece que el número de microorganismos inactivados por unidad de tiempo es proporcional al número de los microorganismos remanentes. Aunque en la práctica se produzcan desviaciones, la Ley de Chick-Watson es una referencia para analizar la cinética del proceso a partir de la concentración inicial de microorganismos y la concentración final al cabo de un tiempo de contacto con el desinfectante. A esta relación se la conoce como factor CT (producto de la Concentración del bactericida en mg/L, como media residual, por el tiempo de contacto T en minutos), (Ramirez, 2017).

La desinfección del agua se logra con desinfectantes químicos y físicos.

Un desinfectante ideal debería:

- Inactivar eficazmente microorganismos patógenos en un amplio rango de condiciones físicas y químicas.
- Permitir el control de su eficacia de forma continuada.
- Proporcionar protección continua contra microorganismos patógenos que puedan contaminar las instalaciones del sistema de distribución en fases posteriores.
- Proporcionar un residuo de desinfectante que sea estable y fácil de detectar y cuantificar.
- Producir niveles mínimos de subproductos.
- Estar fácilmente disponible, ser seguro de manipular y adecuado para un uso generalizado.
- No degradar su calidad o resistencia durante el almacenamiento.
- Ser asequible (tanto en términos monetarios como de costos operativos).

Actualmente, ningún desinfectante cumple todos estos criterios simultáneamente. Elegir el apropiado es una decisión importante para una gestión eficaz de la calidad del agua potable en cualquier abastecimiento. Entre los factores que influyen en esta decisión se incluyen: la calidad del agua de origen que se está tratando, las características del sistema de abastecimiento y otras circunstancias locales específicas (*Australian Drinking Water Guidelines 6*, 2011 Version 3.8 Updated September 2022).

Los procesos de desinfección más comúnmente utilizados son la cloración y la cloraminación, pero también se utilizan el dióxido de cloro, el ozono y la desinfección UV.

En el caso de *Cryptosporidium*, existen evidencias de que los ooquistes son extremadamente resistentes al cloro. No se observó inactivación incluso después de 18 horas de contacto con cloro a niveles muy superiores a las concentraciones normales de este desinfectante en el agua de consumo (0,2-1 mg/L), y no se observó inactivación con cloraminas (Betancour, 2004). Por lo tanto, la cloración (en las concentraciones y tiempos de exposición normalmente usados en las ETAP) es inefectiva para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium*.

El dióxido de cloro es ligeramente más efectivo, pero aún requiere un CT alto de 75–1 000 mg/L x min para una inactivación del 99% de los ooquistes (Organización Mundial de la Salud, 2009).

***Tabla 4**. Valores de CT para la inactivación de Cryptosporidium con dióxido de cloro (mg/L x min) (USEPA, 1999)*

Log	Temperatura del agua (°C)										
	≤0,5	1	2	3	5	7	10	15	20	25	30
0,25	159	153	140	128	107	90	69	45	29	19	12
0,5	319	305	279	256	214	180	138	89	58	38	24
1,0	637	610	558	511	429	360	277	179	116	75	49
1,5	956	915	838	767	643	539	415	268	174	113	73
2,0	1 275	1 120	1 117	1 023	858	719	553	357	232	150	98
2,5	1 594	1 525	1 396	1 278	1 072	899	691	447	289	188	122
3,0	1 912	1 830	1 675	1 534	1 286	1 079	830	536	347	226	147

El ozono se puede utilizar eficazmente para la desinfección. Así, dosis relativamente bajas (0,331 mg/L) y tiempos de exposición muy cortos (1 min) son capaces de inactivar hasta el 99% de los quistes/ooquistes. No obstante, un estudio de Haas y Kaymak (2003) sugiere que, en aguas pretratadas destinadas al consumo humano con bajas concentraciones de organismos, la tasa de inactivación es menor que la observada en estudios donde la concentración de microorganismos se incrementa artificialmente con el fin de observar varios órdenes de magnitud de inactivación (Betancour, 2004). La eficacia del ozono se reduce a temperaturas más bajas y los valores de CT necesarios para la inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium* a bajas temperaturas son, por lo tanto, altos. Además de la temperatura, la eficacia del ozono también depende del pH y de la turbidez del agua.

Sin embargo, el rango práctico de los valores de CT son limitados, ya que CT elevados pueden dar lugar a la formación de altas concentraciones de subproductos (geno)tóxicos (Organización Mundial de la Salud, 2009).

***Tabla 5.** Valores de CT para la inactivación del 99% (2 log) para varios microorganismos con ozono[1]*

Microorganismo	Valores de CT (mg/L x min)	Referencia
Escherichia coli	0,02	USEPA 1999
Virus entéricos	0,6	USEPA 1999
Giardia	0,5-0,6	Wickramamayake et al. (1984)
Cryptosporidium	32	USEPA 2010

[1]A una temperatura del agua de 5 °C. un pH de 7 para *Giardia* y pH entre 6–9 para otros organismos. Los valores de la tabla se basan en valores publicados y deben considerarse como los valores mínimos necesarios para lograr una desinfección eficaz. 7

***Tabla 6**. Valores de CT para la inactivación de Cryptosporidium con ozono (mg/L x min) (USEPA, 1999)*

LOG	Temperatura del agua (°C)										
	≤0,5	1	2	3	5	7	10	15	20	25	30
0,25	6,0	5,8	5,2	4,8	4,0	3,3	2,5	1,6	1,0	0,6	0,39
0,5	12	12	10	9,5	7,9	6,5	4,9	3,1	2,0	1,2	0,78
1,0	24	23	21	19	16	13	9,9	6,2	3,9	2,5	1,6
1,5	36	35	31	29	24	20	15	9,3	5,9	3,7	2,4
2,0	48	46	42	38	32	26	20	12	7,8	4,9	3,1
2,5	60	58	52	48	40	33	25	16	9,8	6,2	3,9
3,0	72	69	63	57	47	39	30	19	12	7,4	4,7

Más recientemente se ha demostrado que la desinfección con luz UV es eficaz contra *Cryptosporidium*. Esta tecnología está siendo adoptada con más frecuencia para el tratamiento del agua potable. Se ha visto que dosis relativamente bajas de UV (19 mJ/cm^2) inactivan 2–4 log (99–99,99%) de los ooquistes de *Cryptosporidium* y de los quistes de *Giardia* (Craik et al., 2000; Linden et al., 2002).

La USEPA ha desarrollado una guía detallada sobre la aplicación de UV para la inactivación de *Cryptosporidium*, incluida la relación entre dosis y log reducción, así como aspectos de diseño de plantas, validación de procesos y cuestiones operativas (USEPA, 2006). La eficacia de la desinfección con UV dependerá de los valores de turbidez, color, hierro y absorbancia UV del agua.

***Tabla 7.** Dosis para alcanzar una inactivación del 99% (2 log) de varios microorganismos con radiación UV*

Patógeno diana	*Dosis para agua de bebida en (mJ/cm²) para alcanzar una reducción de 2 log*
Cryptosporidium	**5,8**
Giardia	5,2
Virus	100
Escherichia coli	9

***Tabla 8**. Valores de CT para la inactivación de Cryptosporidium con radiación UV (mJ/cm^2) (USEPA, 1999)*

LOG	Dosis UV (mJ/cm^2) *Cryptosporidium*	Dosis UV (mJ/cm^2) *Giardia*	Dosis UV (mJ/cm^2) Virus
0,5	1,6	1,5	39
1,0	2,5	2,1	58
1,5	3,9	3,0	79
2,0	5,8	5,2	100
2,5	8,5	7,7	121
3,0	12	11	143
3,5	15	15	163
4,0	22	22	186

Se ha demostrado que la exposición de los ooquistes de *Cryptosporidium* a una secuencia de diferentes desinfectantes es más efectivo que el uso de cualquiera de los desinfectantes individualmente. Este fenómeno, conocido como sinergismo, sugiere que el efecto combinado de múltiples desinfectantes supera la suma de sus efectos individuales (Finch et al., 1994; Liyanage et al., 1997). También se ha comprobado que la combinación de procesos de desinfección y otras condiciones ambientales adversas, como las que ocurren durante la filtración con arena, puede disminuir aún más la infectividad de los ooquistes. Estos hallazgos sugieren que el estrés acumulativo al que se enfrentan los ooquistes en ambientes naturales y de tratamiento juegan un papel crucial en la reducción de su viabilidad e infectividad (Parker et al, 1993).

Tabla 9. *Eficiencia en la eliminación de Cryptosporidium de diferentes procesos del tratamiento [adaptado de USEPA Cryptosporidium: Drinking Water Health Advisory, 2001]*

Descripción del proceso de tratamiento	Eliminación lograda (log)		
	Estudios en laboratorio Balance comparativo	Estudios en plantas piloto	Estudios en plantas reales
Coagulación + Floculación	< 1,0	1,4 – 1,8	0,4 – 1,7
Coagulación + Filtración		2,7 – 5,9	1,6 – 4,0
		2,5 – 3,8	
		2,7 – 2,9[1]	
Coagulación + Floculación + Filtración		4,2 – 5,2	1,6 – 4,0
		> 5,3	< 0,5 – 3,0
		2,1 – 2,8[1]	1,0 – 2,5
Coagulación + Aire Disuelto Flotación	2,0 – 2,6		
Filtración lenta de arena		> 3,7	
Filtración de tierra de diatomeas		> 4,0	
Coagulación + Microfiltración		> 6,0	
Ultrafiltración		> 6,0	

[1]Rango de eficiencias de eliminación promedio según las fuentes de agua del embalse y del río. Fuente: Adaptado de Frey et al. (1998)

3.2. Medidas preventivas

A continuación, se presenta una recopilación de las recomendaciones recogidas en la literatura para las diferentes fases de captación y tratamiento que podrían implementarse en función de las características de las instalaciones del abastecimiento concreto y de las evaluaciones de riesgo que se realicen.

3.2.1. Fase de captación y pretratamiento

- Instalar corriente arriba drenajes para minimizar la contaminación de la escorrentía.
- Asegurar que la cámara de captación está cubierta y construida de manera que el agua no pueda entrar a través de la toma.
- Instalar turbidímetros que permitan operar válvulas automáticas de corte.
- Vallado de la zona de captación para evitar la entrada tanto de animales como de personas ajenas a la instalación. Inspecciones y reparaciones regulares.
- Uso de sistemas automáticos para detectar fenómenos de contaminaciones accidentales procedentes de inundaciones o alertar sobre ellos.
- Estudio de las repercusiones de la actividad humana y la información sobre las presiones significativas o que superan un umbral definido a partir del cual se puede poner en riesgo el cumplimiento de los objetivos medioambientales en una masa de agua, recopilada de conformidad con las secciones 3.ª y 5.ª del capítulo I del título I del Reglamento de la Planificación Hidrológica, aprobado por el Real Decreto 907/2007, de 6 de julio.
- Control adecuado de las aguas en las zonas de captación: Incluir en el Programa de control de aguas destinadas a abastecimiento (Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre) a *Cryptosporidium,* cuando se considere pertinente.
- Evaluación y clasificación sistemática del riesgo potencial de contaminación de las aguas de captación por *Cryptosporidium* mediante la aplicación de un enfoque que evalúe la fuente (humana o animal), la cuenca

y los factores hidrogeológicos. Utilización de los mapas nacionales de vulnerabilidad de las aguas subterráneas y los esquemas de zonificación existentes para evaluar el riesgo de contaminación con *Cryptosporidium*.

- Evaluar el riesgo de *Cryptosporidium* de cada fuente y establecer un procedimiento para actualizar la revisión de la evaluación de riesgos. Revisión de los sistemas de monitoreo en función del nivel de riesgo.

3.2.2. Fase de coagulación-floculación

Las operaciones de tratamiento de agua deberán realizarse en todo momento, de manera que se minimice la turbidez en el agua final, incluyendo:

- Prestar atención a otros parámetros que reflejan el rendimiento de la coagulación química, mediante los procesos de control específicos que resulten aplicables.
- Verificar periódicamente los procesos de coagulación-floculación para cumplir con las condiciones cambiantes de la calidad del agua de origen y otros factores ambientales.
- Las plantas de tratamiento de agua deben operar dentro de su capacidad de diseño sin que se vean afectados los procesos de separación de sólidos y líquidos, que son responsables de la eliminación de la turbidez y los sólidos coagulantes.
- La coagulación en sí no debe ser comprometida ni evitada en ninguna circunstancia.
- En situaciones en las que se necesite incrementar el volumen de agua a tratar por aumento de la demanda (de forma que suponga una sobrecarga operativa de la ETAP) o evitar los procesos de separación sólido-líquido, se debe iniciar un régimen de monitoreo estricto para garantizar que no se excedan los objetivos de turbidez de los procedimientos internos de trabajo. Si hay indicios de que estos objetivos no se alcanzarán, se debe emitir un aviso inmediato de alarma.

Como recomendación para monitorizar las fases de coagulación-floculación, puede seguirse la siguiente tabla, adaptada de la guía australiana (*Australian Drinking Water Guidelines 6*, 2011 Version 3.8 Updated September 2022).

Tabla 10. *Ejemplo de un programa de monitoreo operativo (características y frecuencias)*

Coagulación (entrada al tanque de floculación)	pH	Diario/Continuo	Optimizar el pH para una coagulación eficaz de los coagulantes seleccionados cuando cambie la calidad del agua bruta. Proporcionar alarma si el pH está fuera de los límites establecidos.
Floculación (último compartimento)	Características del flóculo	Diario/Basado en eventos	Optimizar las características del flóculo para una clarificación o filtración eficaz cuando se produzcan cambios en la calidad del agua bruta o en las condiciones operativas.
Clarificador (salida de agua clarificada)	Turbidez Color Observación visual de flóculos o mantas floculadas.	Diario/Continuo Diario/Basado en eventos	Confirmar que las operaciones de dosis de coagulante, corrección de pH, floculación y clarificación estén optimizadas cuando se produzcan cambios en la calidad del agua bruta o en las condiciones de operación. Proporcionar alarma si la turbidez supera el límite establecido. Evaluar si es necesario realizar ajustes en el proceso para mejorar la estabilidad del proceso de clarificación.

3.2.3. Fase de filtración

En esta fase es fundamental que los equipos de filtración se encuentren en buen estado operativo para que puedan llevar a cabo su función de manera efectiva, siendo el parámetro “turbidez” un buen indicador del rendimiento de los filtros, recordándose que, como ya se indicó en el apartado de Consideraciones generales

para la Fase de filtración, no debe entenderse que una turbidez baja por sí sola indique necesariamente la reducción del riesgo a niveles aceptables en determinadas circunstancias.

Es por ello que la mayor parte de las medidas preventivas a adoptar descritas a continuación (*Australian Drinking Water Guidelines 6*, 2011 Version 3.8 Updated September 2022) están dirigidas a su estricto control y seguimiento:

- Monitorizar de manera continua la turbidez del agua filtrada. Es muy recomendable la instalación de turbidímetros en continuo a la salida de cada filtro individual, ya que monitorizar únicamente el efluente combinado de todos los filtros podría no detectar problemas en el rendimiento de un filtro en concreto (Mosse y Murray, 2008).
- Definir un límite crítico (LC) que indique un funcionamiento inaceptable del proceso que suponga que haya un riesgo significativo para la salud. Mediciones de turbidez que superen ese LC son indicativas de una pérdida de control en el proceso que puede comprometer la inactivación/eliminación del patógeno. Para asegurar que no se superan los LC se pueden establecer límites objetivo fijados por el operador. A ese límite objetivo se le puede incorporar también un periodo de tiempo en el que dicho límite ha de superar de manera continua el valor para que se genere una alarma (Mosse, 2009).
- Instalar un sistema de alarma que avise al operador cuando la turbidez de un filtro individual supere el límite objetivo de manera continua, o bien durante un tiempo superior al periodo de tiempo establecido.
- Gestionar de manera apropiada las aguas de lavado de filtros. Evitar la recirculación.
- Minimizar los incrementos de turbidez durante las puestas en marcha iniciales y operativas de los filtros, para evitar aumentos repentinos de flujo. Controlar que no se produzcan aumentos puntuales de turbidez en el momento de entrada en servicio de los filtros (Badenoch, 1995; Bouchier, 1998).
- Inspeccionar regularmente los equipos y llevar a cabo un correcto mantenimiento de estos.
- Formación adecuada del personal que lleva a cabo el control y mantenimiento de los equipos de filtración.
- Realizar ensayos diarios de integridad de las membranas según las indicaciones del fabricante (microfiltración/ultrafiltración).
- Calibrar de forma periódica los turbidímetros.

3.2.4. Fase de desinfección

- Mantenimiento de rutina de los elementos del sistema de dosificación.
- Sustituir cualquier elemento del sistema de dosificación si se sospecha un mal funcionamiento de este.
- Disponer de elementos duplicados.
- Sistema de alarma para advertir si la concentración de desinfectante disponible es incorrecta (en continuo o manual).
- Controles manuales periódicos en las concentraciones de desinfectante disponible, especialmente durante los periodos de variabilidad en la calidad del agua.
- Calibrar de forma periódica el dosificador y el analizador.

3.3. Medidas correctoras ante diferentes escenarios posibles

Para ilustrar las medidas correctoras derivadas de la presencia de *Cryptosporidium* en abastecimientos con ETAP, se plantean tres posibles escenarios:

1. **Escenario 1**: Detección de *Cryptosporidium* en agua de abastecimiento sin brote de gastroenteritis aguda (GEA)
2. **Escenario 2:** Detección de *Cryptosporidium* en agua de abastecimiento con brote de GEA y sin confirmación de *Cryptosporidium* por examen de heces como el agente causal
3. **Escenario 3a**: Brote de GEA en la comunidad con confirmación de *Cryptosporidium* en el examen de heces como agente causal y con presencia de *Cryptosporidium* en el agua del abastecimiento
4. **Escenario 3b**: Brote de GEA en la comunidad con/sin confirmación de *Cryptosporidium* como agente causal (coprocultivo) y sin estudio previo de la presencia de *Cryptosporidium* en el agua de abastecimiento

Escenario 1: Detección de *Cryptosporidium* en agua de abastecimiento sin brote de gastroenteritis aguda (GEA)

Las actuaciones cuando se detecta *Cryptosporidium* en el agua (agua bruta y/o tratada) tras la evaluación de eventos recogidos en el plan sanitario del agua del abastecimiento (PSA) y su evaluación del riesgo, serán las siguientes:

1. **Informar a las autoridades sanitarias**, que en el caso de presencia de *Cryptosporidium* en el agua tratada, prohibirá el uso de consumo (bebida, lavado de dientes, cocinar, lavar alimentos que se consumirán crudos, baños de niños de corta edad, inmunodeprimidos, etc.), hasta que se descarte la presencia de *Cryptosporidium* en agua. Del mismo modo, alertarán a las unidades de epidemiología.
2. **Determinar la especie y genotipo** del parásito detectado en el agua del abastecimiento puede ser de gran ayuda, no solo para identificar posibles fuentes de contaminación, sino también para valorar la posibilidad de afección en humanos.
3. **Tomar las medidas correctoras** y actuaciones siguientes en el abastecimiento:
    - <u>En la fase de captación y pretratamiento</u>:
        - Valorar la posibilidad de utilización de otros recursos y emplearlos si existen.
        - Puesta fuera de servicio y observación de la evolución de la calidad del agua de la captación.
    - <u>En la fase de coagulación-floculación</u>:
        - Prueba de jarras (ensayo de laboratorio que permite simular las etapas de coagulación-floculación) para seleccionar los productos químicos y sus dosis, para control y optimización de coagulantes.

- Uso de productos químicos auxiliares, tales como coadyuvantes coagulantes, coadyuvantes floculantes o coadyuvantes de filtración.
- Ajuste del pH.
- Verificar las diferentes velocidades de alimentación de productos químicos y puntos de alimentación.

- En la fase de filtración:
  - Revisión del estado de los filtros y estimación de los valores de turbidez para comprobar que se ajustan a lo establecido en el PSA del abastecimiento. En caso de que alguno de los filtros no proporcione un adecuado rendimiento, estudio de la posible causa y actuación sobre ella para solventar el problema (por ejemplo: lavados sucesivos del filtro, reponer relleno). Mientras tanto, dejar el filtro afectado fuera de servicio.
  - Reducción del caudal de agua a tratar por cada uno de los filtros, para evitar una posible sobrecarga.
  - Introducción de métodos de filtración adicionales, o potenciación de los ya existentes.
  - Uso de coadyuvantes de filtración.
  - En caso de recirculación del agua de lavado de filtros, suspensión de esta práctica y gestión adecuada de las aguas.
- En la fase de desinfección:
  - Valorar el aumento de la dosis de desinfectante residual en red, teniendo en cuenta la generación de subproductos de la desinfección.
  - Valorar añadir un sistema de desinfección eficaz frente a *Cryptosporidium* (UV, ozono) en función del número de ooquistes a la entrada de la planta y ajustar parámetros (pH, turbidez, color).
  - Limpieza, desincrustación y desinfección de depósitos afectados.

Escenario 2: Detección de *Cryptosporidium* en agua de abastecimiento con brote de GEA y sin confirmación de *Cryptosporidium* por examen de heces como el agente causal

Aplicar las medidas correctoras propuestas en el escenario 1, más:

- **Recomendar a las autoridades sanitarias** la elaboración de un plan de comunicación a la población con las medidas de precaución que se estimen necesarias en cada momento en función de la evolución del brote.
- Para la investigación del agente causal del brote: **recomendar exámenes coproparasitarios** en pacientes con GEA asociados al brote. En caso de que el coprocultivo confirme que el *Cryptosporidium* es el agente causal se debe pasar al escenario 3.

Escenario 3a: Brote de GEA en la comunidad con confirmación de *Cryptosporidium* en el examen de heces como agente causal y con presencia de *Cryptosporidium* en el agua del abastecimiento

- Aplicar las medidas correctoras propuestas en el escenario 1, más: Elaboración por las autoridades sanitarias de un plan de comunicación a la población con las medidas de precaución que se estimen necesarias en cada momento en función de la evolución del brote.
- Limpieza, desincrustación y desinfección de los depósitos y redes de distribución de la zona de abastecimiento que suministran a la población afectada.
- Incorporar un sistema de desinfección eficaz frente a *Cryptosporidium* (UV, ozono) y/o un sistema de eliminación (ultrafiltración u ósmosis inversa).

Escenario 3b: Brote de GEA en la comunidad con/sin confirmación de *Cryptosporidium* como agente causal (coprocultivo) y sin estudio previo de la presencia de *Cryptosporidium* en el agua de abastecimiento

- Buscar en coprocultivo la presencia de *Cryptosporidium*.
- Buscar en agua bruta, en entrada de planta y en salida de planta la presencia de *Cryptosporidium*. En caso de que se encuentre en agua pasamos al escenario 3a.

4. Presencia de Cryptosporidium en abastecimientos sin ETAP

4.1. Evaluaciones de fuentes de agua

4.2. Barreras de tratamiento adecuadas

4.3. Mantenimiento y operación adecuados de los sistemas de distribución

4.4. Medidas correctoras

4.4.1. Escenario 1: Detección de *Cryptosporidium* en agua de abastecimiento sin brote de GEA

4.4.2. Escenario 2: Detección de *Cryptosporidium* en agua de abastecimiento con brote de GEA y sin confirmación de *Cryptosporidium* por examen de heces como el agente causal

4.4.3. Escenario 3a: Brote de GEA en la comunidad con confirmación de *Cryptosporidium* en el examen de heces como agente causal y con presencia de *Cryptosporidium* en el agua del abastecimiento

4.4.4. Escenario 3b: Brote de GEA en la comunidad con o sin confirmación de *Cryptosporidium* como agente causal (coprocultivo) y sin estudio previo de la presencia de *Cryptosporidium* en el agua de abastecimiento

4.5. Consideraciones en caso de prohibición de uso del agua de consumo por sospecha o confirmación de presencia de *Cryptosporidium* y brote de GEA

Una zona de abastecimiento sin ETAP es la que consta únicamente de procesos unitarios de filtración y desinfección como tratamiento de potabilización del agua. En estos casos, ante la limitación de herramientas para el tratamiento del agua, la exposición a *Cryptosporidium* debe reducirse mediante la implementación de un plan sanitario del agua (PSA) que proporcione orientación para identificar e implementar las medidas necesarias de gestión de riesgos adaptadas a las características de este tipo de abastecimientos.

La implantación de este PSA requiere una evaluación del sistema que implique:

- Caracterizar la fuente de origen del agua.
- Identificar las condiciones que pueden resultar en contaminación.
- Describir las barreras de tratamiento que previenen o reducen la contaminación.
- Identificar medidas de control para mitigar esos riesgos a través de los sistemas de tratamiento y distribución al consumidor.

4.1. Evaluaciones de fuentes de agua

La inspección de las fuentes de agua debe ser parte de las evaluaciones rutinarias del sistema. Debería incluir la identificación de fuentes potenciales de contaminación fecal humana y animal en la masa de agua.

Se ha demostrado que las zonas de amortiguamiento con vegetación y pastizales proporcionan una medida eficaz para reducir la contaminación por ooquistes de *Cryptosporidium* de las fuentes de agua superficial debido a la escorrentía agrícola (Tate et al., 2004; Atwill et al., 2006).

Es también imprescindible el cumplimiento de la normativa para la adecuada construcción y abandono de pozos y drenajes de protección del pozo. Con respecto al mantenimiento, es importante la conservación de las protecciones de las captaciones para evitar la contaminación del agua bruta con agua procedente de circuitos urbanos o ganaderos, y de la integridad de la estructura de la toma de captación (revisión anual de infraestructuras con especial atención a la aparición de grietas, hundimiento del brocal del pozo de la captación, entrada de raíces y rotura de tuberías o tapa sanitaria).

Se considerarán posibles vías y/o eventos de riesgo (por ejemplo, lluvias, deshielo, condiciones de bajo flujo para ríos que reciben descargas de tratamiento de aguas residuales) por los cuales los protozoos pueden contaminar la fuente de agua y afectar su calidad; y otras condiciones que probablemente conduzcan a concentraciones máximas.

Idealmente, también se debería incluir una monitorización de rutina para *Cryptosporidium* para establecer una línea de base, e identificar concentraciones máximas durante eventos específicos. De forma complementaria, esta monitorización también podría incluir muestras de heces de animales domésticos y salvajes con el fin de conocer la presencia y diversidad de especies de *Cryptosporidium* en reservorios animales que pueden actuar como potenciales focos de contaminación ambiental.

Las evaluaciones de las fuentes de agua también deben considerar el peor escenario para esa fuente concreta. Es importante comprender los posibles aportes fecales al sistema para determinar el “peor escenario posible”, ya que serán específicos del sitio. Por ejemplo, puede haber un breve período de mala calidad del agua asociado a fenómenos atmosféricos adversos como tormentas. Esta degradación, en cortos periodo de tiempo, de la calidad del agua puede representar la mayor parte del riesgo en un sistema de agua potable.

Esta evaluación debe considerar también las fuentes subterráneas para determinar si el suministro es vulnerable a la contaminación por protozoos entéricos y otros patógenos de transmisión fecal-oral, incluyendo, como mínimo, una evaluación hidrogeológica y un estudio de las actividades y características físicas del área.

4.2. Barreras de tratamiento adecuadas

Como la mayoría de las aguas superficiales y los suministros vulnerables a la contaminación por protozoos entéricos están potencialmente sujetos a contaminación fecal, se deben implementar tecnologías de tratamiento para lograr una eliminación y/o inactivación mínima de 3 log (99,9%) de los ooquistes de *Cryptosporidium*. En muchas fuentes de agua superficial puede ser necesaria una reducción logarítmica mayor.

Las reducciones logarítmicas se pueden lograr mediante procesos de eliminación física, como filtración, y/o procesos de inactivación, como la desinfección con luz UV. Generalmente, el tratamiento mínimo de los

suministros derivados de aguas superficiales o fuentes vulnerables a la contaminación por protozoos entéricos debe incluir una filtración adecuada (o tecnologías que proporcionen un crédito de reducción logarítmica equivalente) y desinfección. El tipo y nivel de tratamiento apropiados deben tener en cuenta las posibles fluctuaciones en la calidad del agua, incluida la degradación a corto plazo de su calidad y la variabilidad en el desempeño del tratamiento. Las pruebas piloto u otros procesos de optimización pueden ser útiles para determinar la variabilidad del tratamiento. La filtración es una operación por la que se separa la fase sólida de un fluido. Muchos contaminantes habituales en el agua, como virus, metales, etc., pueden asociarse a partículas y ser eliminados de esta forma por la filtración. Hay diferentes procesos de separación en función de los tamaños que se necesiten separar, en este caso los ooquistes de *Cryptosporidium* tienen un diámetro de entre 4–6 micras. Para la adecuada gestión del sistema de filtración hay que atender a los requerimientos del fabricante, pero en general es necesario respetar las velocidades de trabajo de los filtros y garantizar su correcto mantenimiento.

Con respecto a la elección de los sistemas/materiales de filtración, se consideran dos posibilidades:

- Filtración lenta con capa superficial de organismos vivos adecuada cuando se necesita una reducción de entre 2–3 log. Después de lavados de filtros superficiales, la calidad del agua filtrada no es satisfactoria hasta que se forme de nuevo la membrana biológica de superficie, lo que puede llevar varios días.
- La filtración rápida es adecuada solo para partículas con tamaños entre 10 µm y 1mm, por lo que su utilidad es muy limitada, pero puede mejorarse su eficacia con una combinación de filtros de arena con otros sustratos, como es el caso de la tierra de diatomeas, lo que permite retener compuestos indeseables.

Es necesario un adecuado mantenimiento de los filtros, por lo que se deben establecer periodicidades de mantenimiento fundamentadas y adecuadas por operadores formados.

Las limpiezas de filtros deben programarse siempre antes de la colmatación o perforación de estos.

Otras medidas de prevención después de una limpieza podrían ser: reducir la velocidad de filtrado las primeras horas tras el lavado de filtros o desviar hacia residuales el primer efluente.

En caso de una emergencia, si se requiere trabajar produciendo volúmenes de agua por encima de lo previsto, superando la velocidad óptima de filtrado, es necesario establecer medidas adicionales por la reducción de la efectividad del filtro.

4.3. Mantenimiento y operación adecuados de los sistemas de distribución

La contaminación de los sistemas de distribución con protozoos entéricos, como el *Cryptosporidium*, ha sido causa de brotes de enfermedad de transmisión hídrica. Como resultado, el mantenimiento de la integridad física/hidráulica del sistema de distribución y la minimización de los eventos de presión negativa o baja son elementos clave para garantizar la seguridad del agua desde la captación hasta el grifo.

Deben evitarse zonas de baja presión en las redes de distribución, instalar válvulas antirretorno, revisar el trazado para comprobar que no hay cruces entre residuales y potables, y mantener prácticas higiénicas adecuadas durante la construcción, mantenimiento, limpieza y manejo de las infraestructuras.

Se debe monitorizar periódicamente la calidad del agua del sistema de distribución (por ejemplo, indicadores microbianos, residuos de desinfectante, turbidez, pH) e implementar programas de operación/mantenimiento periódico (por ejemplo, limpieza de la tubería principal de agua, control de conexiones cruzadas, etc.).

4.4. Medidas correctoras

Para ilustrar las medidas correctoras derivadas de la presencia de *Cryptosporidium* en abastecimientos sin ETAP, se plantean cuatro posibles escenarios:

1. **Escenario 1**: Detección de *Cryptosporidium* en agua de abastecimiento sin brote de GEA.
2. **Escenario 2**: Detección de *Cryptosporidium* en agua de abastecimiento y brote de GEA sin confirmación de agente causal.
3. **Escenario 3a**: Detección de *Cryptosporidium* en agua de abastecimiento y brote de GEA con confirmación por coprocultivo de *Cryptosporidium* como agente causal.
4. **Escenario 3b**: Brote de GEA con sospecha epidemiológica de origen hídrico.

Escenario 1: Detección de *Cryptosporidium* en agua de abastecimiento sin brote de GEA

Cuando se detecta *Cryptosporidium* en el agua (agua bruta y/o tratada) tras la evaluación de eventos recogidos en el PSA del abastecimiento y su evaluación del riesgo, las actuaciones serán las siguientes:

1. **Informar a las autoridades sanitarias**, que en el caso de presencia de *Cryptosporidium* en el agua tratada, prohibirá el uso de consumo (bebida, lavado de dientes, cocinar, lavar alimentos que se consumirán crudos, baños de niños de corta edad e inmunodeprimidos, etc.), hasta que se descarte la presencia de *Cryptosporidium* en agua. Del mismo, alertarán a las unidades de epidemiología.
2. **Determinar la especie y genotipo** del parásito detectado en el agua del abastecimiento puede ser de gran ayuda, no solo para identificar posibles fuentes de contaminación, sino también para valorar la posibilidad de afección en humanos.
3. **Tomar las medidas correctoras** y actuaciones a llevar a cabo en el abastecimiento:
    - <u>En la fase de captación y pretratamiento</u>: buscar otro recurso y emplearlo si existe; en el caso de que no exista, utilizar cisternas para el transporte de agua desde una ETAP al depósito de del abastecimiento afectado.
    - <u>En el caso de que sólo haya desinfección</u>, se debe instalar de forma urgente un filtro, al menos, de arena.
    - <u>Si se dispone de filtración</u>: Revisión del estado de los filtros y del proceso de filtración (adecuada velocidad de filtración y adaptado a la temperatura del agua) estimación de los valores de turbidez para comprobar que se ajustan a lo establecido en el PSA del abastecimiento. En caso de que alguno de los filtros no proporcione un adecuado rendimiento, estudio de la posible causa y actuación sobre ella para solventar el problema (por ejemplo: lavados sucesivos del filtro, reponer relleno). Mientras tanto, utilizar otros sistemas de filtración (cartuchos de ultrafiltración u ósmosis inversa). Reducción del caudal de agua a tratar por el filtro, para evitar una posible sobrecarga.
    - <u>En la fase de desinfección</u>:
        - Valorar el aumento de la dosis de desinfectante residual en red, teniendo en cuenta la generación de subproductos de la desinfección.

- Añadir un sistema de desinfección eficaz frente a *Cryptosporidium* (UV, ozono), ajustando parámetros (pH, turbidez, color).
- Limpieza, desincrustación y desinfección de depósitos.

Escenario 2: Detección de *Cryptosporidium* en agua de abastecimiento con brote de GEA y sin confirmación de *Cryptosporidium* por examen de heces como el agente causal

Aplicar las medidas correctoras propuestas en el escenario 1, más:

- Elaboración por las autoridades sanitarias de un plan de comunicación a la población con las medidas de precaución que se estimen necesarias en cada momento en función de la evolución del brote.
- Investigar el agente causal del brote: recomendar exámenes coproparasitarios en pacientes con GEA asociados al brote. En caso de que el coprocultivo confirme que el *Cryptosporidium* es el agente causal se debe pasar al escenario 3.

Escenario 3a: Brote de GEA en la comunidad con confirmación de *Cryptosporidium* en el examen de heces como agente causal y con presencia de *Cryptosporidium* en el agua del abastecimiento

Aplicar las medidas correctoras propuestas en el escenario 1, más:

- Elaboración por las autoridades sanitarias de un plan de comunicación a la población con las medidas de precaución que se estimen necesarias en cada momento en función de la evolución del brote.
- Limpieza, desincrustación y desinfección de los depósitos de la zona de abastecimiento que suministran a la población afectada.

Escenario 3b: Brote de GEA en la comunidad con o sin confirmación de *Cryptosporidium* como agente causal (coprocultivo) y sin estudio previo de la presencia de *Cryptosporidium* en el agua de abastecimiento

- Buscar en coprocultivo la presencia de *Cryptosporidium*.
- Buscar en agua bruta, en entrada de planta y en salida de planta la presencia de *Cryptosporidium*. En caso de que se encuentre en agua, se debe pasar al escenario 3a.

4.5. Consideraciones en caso de prohibición de uso del agua de consumo por sospecha o confirmación de presencia de *Cryptosporidium* y brote de GEA

El abastecimiento que no tenga planta de tratamiento (ETAP) siempre debe disponer de una fuente alternativa de agua de consumo. Es importante mantener informada a la población y establecer recomendaciones para favorecer la remisión del brote.

Un ejemplo de comunicación podría ser:

Además de la transmisión por el agua de consumo, la criptosporidiosis también puede transmitirse por vía fecal de persona a persona. Por ello, las recomendaciones son las siguientes:

Recomendaciones generales para la población:

- No utilizar agua de red para beber, ni para la higiene bucal.
- Se puede usar agua de la red para aseo personal (pero no higiene bucal), pero no en niños de corta edad e inmunodeprimidos.
- No utilizar agua de red para la preparación de alimentos en crudo, ni bebidas. Comer la fruta pelada y evitar lavar con esa agua alimentos a consumir crudos.

Para las personas que tengan o haya tenido síntomas compatibles con la enfermedad son:

- Para prevenir la extensión de la enfermedad se debe extremar las medidas de higiene personal y el lavado de manos, especialmente tras cambiar pañales de niños o pacientes infectados hasta 48 h después de la desaparición de la diarrea.
- Además, se recomienda el lavado de manos con agua y jabón, especialmente después de ir al baño y antes y después de preparar alimentos. Los desinfectantes de manos a base de alcohol no son eficaces en estos casos.
- Se debe evitar que las personas con síntomas manipulen comida o cuiden de personas hospitalizadas o inmunodeprimidas o en instituciones (residencias, guarderías, etc.) hasta 48 h tras la desaparición de la diarrea.
- Se recomienda que los niños que acuden a guardería se incorporen a la misma transcurridas 48 h desde la desaparición de la diarrea.
- Debido a que el patógeno puede excretarse una vez finalizada la diarrea, se recomienda que los casos eviten bañarse en piscinas durante las 2 semanas siguientes al cese de la diarrea.

5. Presencia de Cryptosporidium en piscinas e instalaciones de uso recreativo

6.1. Origen de *Cryptosporidium* en piscinas e instalaciones de uso recreativo

6.1.1. Mecanismos de transmisión de *Cryptosporidium* spp. a partir del agua de piscinas.

6.1.2. Factores que facilitan la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en el agua de las piscinas

6.2. Medidas preventivas

6.2.1. Diseño del tratamiento y desinfección del agua

6.2.2. Indicaciones para un adecuado mantenimiento y utilización de los sistemas de filtración

6.2.3. Desinfección secundaria

6.2.4. Información a los usuarios

6.3. Medidas Correctoras

Escenario 1: Presencia de heces en el agua (accidente fecal)

Escenario 2: Detección de *Cryptosporidium* o notificación de caso o brote de *Cryptosporidium* asociado a la instalación

5.1. Origen de *Cryptosporidium* en piscinas e instalaciones de uso recreativo

La infección en el ser humano (criptosporidiosis) puede ser provocada por diferentes especies de *Cryptosporidium* spp., sin embargo, *C. hominis* y *C. parvum* son las más comúnmente presentes en muestras clínicas humanas y las responsables de la gran mayoría de los brotes de criptosporidiosis relacionados con piscinas (Ministerio de Sanidad. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2023). Según los resultados descritos en la literatura científica de los estudios microbiológicos moleculares más relevantes realizados en España en el periodo 2007–2017, la gran mayoría de los casos de criptosporidiosis humana en España eran causados por la familia Ib de *C. hominis* (69,2%) y por la familia IIa de *C. parvum* (21,0%) (Ministerio de Sanidad. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2023).

5.1.1. Mecanismos de transmisión de *Cryptosporidium* spp. a partir del agua de piscinas

La presencia de *Cryptosporidium* en el agua de las piscinas usualmente ocurre por la contaminación fecal inadvertida de la misma a partir de bañistas portadores del patógeno.

El mecanismo de transmisión más habitual es indirecto a través del agua contaminada de la piscina que contenga un número suficiente de ooquistes, produciéndose el contagio al ingerir el bañista agua contaminada. En este punto es interesante recordar la capacidad de los quistes de ser infectivos aún en bajas dosis, siendo su dosis mínima infectante de 1 a 30 ooquistes (Fredes Martínez, 2016). En los modelos de evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico (QMRA, por sus siglas en inglés) se considera un mayor riesgo en los bañistas niños que en adultos -para una misma duración del baño- al ingerir los primeros una mayor cantidad de agua (rango de ingesta de agua/bañista de 1,77–65,8 mL en niños vs. 0–88,5 mL en adultos).

En nuestro país, los brotes más habituales se dan en el contexto de aguas de uso recreativo, como pueden ser las piscinas (Ministerio de Sanidad. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2023).

5.1.2. Factores que facilitan la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en el agua de las piscinas

La aparición de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en el agua de piscina no es algo excepcional. En dos estudios realizados en nuestro país, en la provincia de Barcelona, su presencia osciló entre 18,8% y el 54% de las piscinas estudiadas (en un estudio se analizaron 32 piscinas y en el otro 24), con concentraciones máximas de 13 y 30 ooquistes/L, respectivamente (Gracenea et al., 2018; Gómez et al., 2011).

Habitualmente la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en el agua de la piscina procede directamente de los propios bañistas usuarios de la piscina (un paciente infectado o un portador sano) ya sea como consecuencia de un incidente fecal o por residuos de materia fecal en el cuerpo de los bañistas. Aunque se considera mucho más excepcional, determinadas instalaciones al aire libre se pueden ver contaminadas por mascotas u otros animales portadores del parásito.

Como se comentó anteriormente, la infección es más habitual en niños, pero también puede haber adultos asintomáticos portadores que pueden actuar como fuente de infección. La baja dosis infectiva, ID_{50} (dosis de microorganismos que se requiere para infectar al 50% de los individuos expuestos) de alrededor de 132 ooquistes

-pero que puede variar dependiendo del aislado-, contribuye a la propagación de la infección incluso con niveles bajos de contaminación en el agua (Organización Mundial de la Salud, 2006).

En general, los tratamientos de elección para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en agua de piscinas son la ozonización y la radiación ultravioleta. No son desinfectantes con efecto residual, por lo que no pueden sustituir la desinfección con cloro o bromo. Así mismo, añadir floculante a la línea de tratamiento del agua antes de filtros de arena puede tener eficacia en la eliminación de los ooquistes, dependiendo del tiempo de contacto, la mezcla y la velocidad de filtración (Lu & Amburgey, 2016).

5.2. Medidas Preventivas

El *Real Decreto 742/2013, de 27 de septiembre, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de las piscinas*, en su artículo 11.5, determina la obligatoriedad de disponer de un protocolo de autocontrol específico de la piscina, que siempre estará en la propia piscina a disposición del personal de mantenimiento y de la autoridad competente, debiendo actualizarlo con la frecuencia necesaria en cada caso.

Este protocolo de autocontrol se debe basar en el análisis de riesgos y deberá contemplar, al menos, los siguientes aspectos:

a) Tratamiento del agua de cada vaso.

b) Control del agua.

c) Mantenimiento de la piscina.

d) Limpieza y desinfección.

e) Seguridad y buenas prácticas.

f) Plan de control de plagas.

g) Gestión de proveedores y servicios.

Asimismo, el artículo 11.6 establece que "*ante la sospecha de un riesgo para la salud de los usuarios o en función de datos históricos de esa piscina, la autoridad competente podrá requerir al titular de la misma que incluya en su protocolo de autocontrol los parámetros, puntos de muestreo, muestreos complementarios, y otros criterios de calidad que considere necesarios o incrementar la frecuencia de muestreo o establecer valores más estrictos que los señalados en este real decreto que crea oportunos para salvaguardar la salud de los usuarios*".

En virtud de esta normativa, los titulares de las piscinas deberían incluir en sus protocolos de autocontrol el riesgo de contaminación por *Cryptosporidium*.

Para reducir el riesgo de *Cryptosporidium* en las instalaciones acuáticas objeto de este capítulo se debe incidir en aspectos relacionados con:

1) El diseño del tratamiento y desinfección del agua.
2) Desinfección secundaria.
3) El mantenimiento de las instalaciones.
4) Los mensajes de sensibilización a los usuarios.

5.2.1. Diseño del tratamiento y desinfección del agua

Se ha evidenciado que las concentraciones de desinfectante establecidas en el RD 742/2013 (0,5–2 mg/L o ppm de cloro libre residual) no inactivan los ooquistes de *Cryptosporidium*. En agua recreativa clorada a pH 7,5 y a temperaturas habituales en una piscina, se ha estimado que para conseguir una reducción de la concentración de ooquistes de 3 log se requiere un valor de CT de 15 300 mg x min/L (Shields et al., 2008). Para alcanzar esta dosis de desinfectante se deben aplicar residuales de cloro de 20 mg/L durante 12,75 o 13 horas, o de 10 mg/L durante 25,5 horas, resultando en dosis incompatibles con el baño en las mismas.

Por ello resulta imprescindible incluir sistemas complementarios para eliminar potenciales patógenos al mismo tiempo que permiten el uso de las instalaciones.

5.2.1.1. Circulación del agua de piscinas

Las piscinas deben diseñarse de modo que permitan la renovación del agua para limitar la acumulación de contaminantes para los bañistas, desinfectar el agua y eliminar los productos químicos disueltos. El reemplazo del agua de la piscina debe ser parte del mantenimiento integral del sistema de tratamiento.

Para garantizar que toda la piscina reciba correctamente el agua filtrada y desinfectada son esenciales una buena circulación y un diseño hidráulico adecuado. Estos deberían ser diseñados específicamente para cada piscina y los caudales modificados para obtener una circulación óptima del agua de esta. La prueba de tinte se puede utilizar para demostrar la circulación en la piscina. El agua tratada debe llegar continuamente a todas las partes de la piscina, incluidas todas las fuentes de agua, y ser renovada para evitar la acumulación de contaminantes, especialmente en las zonas más utilizadas y contaminadas por los usuarios. Se recomienda que del 75% al 80% del agua reemplazada se tome de la superficie (donde se produce la mayor contaminación), y el resto del fondo de la piscina.

Por ello, se recomienda que la piscina cuente con un sistema de rebose superficial con recirculación.

5.2.1.2. Tasa de recirculación y período de rotación

La tasa de recirculación y el período de rotación están relacionados y forman la base para dimensionar nuevas plantas de tratamiento de agua y comprobar la capacidad de las existentes.

La tasa de recirculación es el flujo de agua en m^3/h hacia y desde la piscina, a través de las tuberías y el sistema de tratamiento de agua.

El período de rotación es el tiempo teórico necesario para que todo el volumen de agua de la piscina pase a través del tratamiento depurador y regrese a la piscina. Cuanto más corto sea el período de rotación, mejor será el tratamiento del agua.

Es importante conocer la tasa de recirculación y el período de rotación del equipo, ya que éste se utilizará al establecer las acciones correctivas que se tomen en caso de accidente de heces líquidas en el agua de la piscina.

5.2.2. Filtración

Los filtros de las piscinas están diseñados para mantener el agua limpia y clara, lo cual es importante para la seguridad física de los usuarios y para permitir una correcta desinfección. Para una filtración adecuada, la recirculación del agua de la piscina debe recoger todo su volumen, sin puntos muertos y debe funcionar de manera continua, al menos, durante el horario de apertura a los bañistas. También los sistemas de filtración deben estar separados para cada piscina en una instalación, especialmente en piscinas para niños pequeños.

La filtración del agua de la piscina es un sistema de recirculación por el que pasa continuamente el agua a través del filtro, lo que debería contribuir a la eliminación de los ooquistes de *Cryptosporidium* de la matriz acuática. No obstante, hay evidencias sugiriendo que para la eliminación de *Cryptosporidium* en filtros de arena, la filtración óptima se logra mediante la dosificación correcta y continua de un coagulante y depende de una buena recirculación y renovación. Cabe recordar aquí que el tamaño del ooquiste es de 4–6 µm.

También se ha estudiado la eficacia sobre la eliminación de los ooquistes de otros medios ultrafiltrantes (a base de diatomeas y perlita) que proporcionan una matriz con poros de diámetro <2 µm, permitiendo la eliminación de *Cryptosporidium* sin necesidad de floculación.

En general, la eficacia de la filtración se reduce a medida que aumenta la velocidad de filtración, por lo que los filtros de velocidad baja o media son más eficaces (Wood et al., 2019).

Los filtros de alta velocidad sólo son adecuados para piscinas pequeñas con baja carga de bañistas. Las clasificaciones de los filtros se basan en la velocidad de filtración de arena:

- Velocidad baja: < 10 $m^3/h/m^2$
- Velocidad media: 10-25 $m^3/h/m^2$
- Velocidad alta: > 25 $m^3/h/m^2$

Por ello, en la instalación de nuevos filtros se recurrirá a filtros de velocidades medias o bajas. En aquellas piscinas que ya dispongan de filtros de alta velocidad, se debería ajustar el lavado a contracorriente (frecuencia mayor a la semanal) y la adición de coagulantes (polielectrolitos catiónicos).

Para garantizar una buena filtración y evitar la penetración de ooquistes de *Cryptosporidium*, los filtros deben lavarse a contracorriente con regularidad.

El lavado a contracorriente de los filtros de velocidad media/baja debe realizarse como mínimo una vez a la semana o con más frecuencia según lo indique el diferencial de presión del filtro y de acuerdo con la documentación del fabricante de los filtros instalados o si la carga de usuarios es alta. Los filtros de alta velocidad requieren ser lavados con una mayor frecuencia en función de la diferencia de presión, pero nunca más de una vez al día.

Diferencias de presión antes y después de la limpieza del filtro de más de 5 psi, 3,6 kg/m^2, o de 3 a 5 metros de altura para filtros de velocidad media, son indicativos de un filtro sucio y de la necesidad de retrolavado.

Todos los filtros de cada piscina deben lavarse a contracorriente el mismo día, después del cierre, una vez que no se vaya a realizar ningún otro uso, para asegurar la eliminación durante la noche de cualquier partícula resultante del retrolavado que podría incluir ooquistes de *Cryptosporidium*.

Se debe pasar el agua por los filtros varias veces antes de que los usuarios vuelvan a utilizar la piscina.

El retrolavado se debe poder controlar visualmente mediante una mirilla en la salida de la tubería del filtro y se debe continuar hasta que el agua salga limpia. El tiempo dependerá del sistema implementado y debe ser especificado por el instalador/fabricante.

Sólo al finalizar el procedimiento de retrolavado se debe completar el volumen de agua de la piscina con agua corriente.

Se deben realizar inspecciones anuales de los filtros para establecer las condiciones de la cubierta y del medio de este.

La adición de coagulantes durante el proceso de filtración entre la bomba de recirculación y el filtro ayuda a eliminar bacterias en general, y es particularmente crucial para ayudar a filtrar protozoos parásitos como *Cryptosporidium* y *Giardia* que, de otro modo, pasarían a través del filtro.

Un sistema de filtración eficaz que incluya la coagulación eliminará más del 90% de los ooquistes de *Cryptosporidium* en un solo paso de filtrado del agua que contenga ooquistes a través del lecho filtrante.

La dosificación de floculantes para incrementar la retención de partículas menores de 20 µm es de 0,5–1 mL de floculantes por m^3/h recirculado. Para el tiempo óptimo de exposición del floculante antes del filtro, esta inyección debe estar instalada 2 metros antes de entrar en el filtro.

Lo ideal es que la dosificación del coagulante se realice mediante sistemas totalmente automatizados, con correcta dosificación en continuo. La eficiencia del coagulante depende del pH, que debe ser menor de 7,5.

5.2.3. Desinfección secundaria

La desinfección secundaria del agua de la piscina (UV u ozono) aumenta la eliminación de microorganismos infecciosos, especialmente el protozoo *Cryptosporidium* resistente al cloro. Debido al riesgo de criptosporidiosis, se recomienda que las piscinas incluyan sistemas de desinfección secundaria para minimizar el riesgo para los bañistas asociado a dichos brotes. Esto es particularmente importante en las piscinas utilizadas por niños pequeños.

Los sistemas de ozono y UV deben diseñarse para proporcionar un efecto equivalente a lograr una reducción del 99% en el número de ooquistes de *Cryptosporidium* en cada paso.

5.2.3.1. Ozono

El gas ozono es un tratamiento realizado en la planta de tratamiento que purifica el agua de la recirculación, haciendo la desinfección posterior más fácil, pero sin dejar residuos en el agua de la piscina. El ozono es especialmente susceptible al agotamiento por materia orgánica y depende en gran medida de la temperatura, ya que su eficacia aumenta con ésta.

El ozono está clasificado como peligroso para la salud y por lo tanto necesita ser eliminado, ya sea mediante filtración por carbón activado o UV dentro del sistema de tratamiento antes de regresar a la piscina.

Cuando en una piscina se instala un tratamiento de ozono que afecta sólo a una proporción del flujo de agua que pasa a través del sistema de depuración (flujo lateral o de rebufo) es inherentemente menos eficaz que la ozonización completa para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium*, y debe ser de al menos el 20% del caudal.

Los sistemas que emplean ozonización total están diseñados para funcionar con una dosis mínima de 0,4 mg/L de ozono con un tiempo de contacto mínimo de 2 a 2,5 minutos, dependiendo del diseño del sistema (BEWA, 1990), consiguiendo un CT de 0,8 mg.min/L (Valor de exposición o CT = tiempo de contacto x residual de desinfección).

5.2.3.2. Radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta es un proceso de desinfección secundario (se utiliza junto con un desinfectante primario, normalmente cloro). Está recomendado, tanto por su capacidad para reducir las cloraminas como para inactivar microorganismos, incluido el *Cryptosporidium* resistente al cloro. Se utiliza cada vez más como alternativa al ozono (que de manera similar complementa la cloración), ya que es más fácil y económico de instalar, especialmente en las plantas existentes.

Características del sistema UV:

-Debe diseñarse para tratar todo el flujo de agua a través del sistema de recirculación de la piscina.

-Si se va a seleccionar basándose en una transmitancia UV (UVT), ese valor supuesto no debe ser superior al 94%, medido con luz UV de 254 nm en una celda de 1 cm.

-Los sistemas UV destinados al control de cloraminas y microorganismos deberán estar equipados con lámparas de media presión (amplio espectro entre 200 y 320 nm).

-Las lámparas de baja presión (254 nm) tienen efecto biocida, pero no tratan directamente las dicloraminas y tricloraminas en la misma medida que lo hacen las lámparas de media presión. Utilizan menos energía que las lámparas de media presión, pero su menor potencia significa que se necesitan más lámparas. Tienen una huella ambiental más grande.

-El sistema debe diseñarse para lograr una reducción mínima de 3 log (99,9%) en el número de ooquistes de *Cryptosporidium* por paso a través del sistema UV. Para garantizar una tasa de dosis efectiva, las instalaciones UV deben ser de presión media, aplicar una dosis de 60 mJ/cm^2 y estar monitoreadas.

-Deben estar validados.

-Debe estar provisto de sensores de intensidad UV calibrados, que miden la salida de todas las lámparas UV instaladas en un sistema. Cuando se instalen varias lámparas, se deberían proporcionar suficientes sensores para controlar todas las lámparas. Los sensores deben revisarse cada seis meses y recalibrarse según lo indicado por el fabricante.

-Debe poder mostrar la dosis de UV, expresada en unidades de energía por unidad de área.

-La cámara y todos sus componentes deben diseñarse para soportar una temperatura de funcionamiento máxima de 40 °C, pero también temperaturas breves ocasionales de hasta 60 °C.

-Las cámaras UV deben estar equipadas con mangas/dedales de cuarzo de alta pureza para separar el agua que pasa a través de la cámara de la fuente UV.

-El sistema UV debe diseñarse para permitir la limpieza de las mangas/dedales de cuarzo sin desmontaje mecánico. El sistema de limpieza deberá ser preferentemente automático; si se selecciona un sistema manual (quizás para una piscina poco utilizada), se debe revisar al menos dos veces al día.

-Se debe proporcionar un drenaje y ventilación en la cámara, que debe estar diseñado de manera que al menos un extremo pueda desmontarse para limpieza general y física.

5.2.4. Información a los usuarios

Los mensajes a los usuarios son clave para la prevención de la contaminación del agua de la piscina y son:

- Ducharse antes de utilizar la piscina, preferiblemente con jabón y desnudo si se dispone de vestuarios cerrados. Asegurarse de que no haya materia fecal adherida a la piel.
- Lavarse siempre las manos después de cambiar pañales o ir al baño.
- Llevar a los niños al baño antes de meterlos en la piscina y ofrecerles descansos frecuentes para ir al baño.
- Los niños que no saben ir al baño deben usar pañal doble impermeable de natación cuando utilice la piscina. No deberían nadar desnudos o usar pañales normales.
- Utilizar las instalaciones proporcionadas para facilitar el cambio de pañales. No se deben cambiar los pañales en las zonas de piscina.

- No ingerir agua de la piscina.
- Las personas con diarrea no deben entrar en contacto con el agua recreativa.
- Las personas que hayan tenido diarrea no deben utilizar las instalaciones acuáticas durante las 48 h posteriores a la desaparición de los síntomas.
- Las personas que, además, han tenido un diagnóstico de criptosporidiosis no deben utilizar las instalaciones acuáticas durante 2 semanas después de que los síntomas hayan cesado.

5.3. Medidas correctoras

Para ilustrar las medidas correctoras derivadas de la presencia de *Cryptosporidium* en piscinas, se plantean dos posibles escenarios:

1. **Escenario 1**: Presencia de heces en el agua (accidente fecal).

2. **Escenario 2**: Detección de *Cryptosporidium* o notificación de caso o brote de *Cryptosporidium* asociado a la instalación.

Escenario 1: Presencia de heces en el agua (accidente fecal)

El establecimiento o titularidad contará con un protocolo de actuación con las indicaciones a seguir por el personal de mantenimiento de la piscina, frente a este tipo de incidentes.

Actuaciones previas

1. Si ocurre un incidente de contaminación fecal en una piscina, tanto si las heces son sólidas, como si son líquidas, se procederá a desalojar inmediatamente a los bañistas y al cierre del vaso.
2. Si el vaso objeto del incidente comparte el sistema de tratamiento (recirculación y filtración del agua) con otros vasos, se procederá al cierre de todos los vasos.
3. Si los bañistas se transfieren entre vasos (por ejemplo., desde un vaso de enseñanza o aprendizaje a un vaso principal o de relajación o van a usar otra piscina), hay que asegurarse de que se duchen antes.
4. Se procederá de la misma forma tras restablecerse la normalidad en el vaso objeto del accidente.
5. Eliminar de forma inmediata la máxima cantidad posible de materia fecal, evitando el goteo y procediendo a su retirada de la forma más higiénica posible (inodoro, desagüe de aguas residuales, etc.). Las heces no deben ser aspiradas con la barredera.
6. Se procederá a la limpieza y desinfección mediante hipoclorito, de todos los elementos que hayan sido utilizados en el proceso.
7. Si se trata de un vaso con poco volumen de agua, lo más indicado es proceder a su vaciado, limpieza y desinfección para luego llenarlo de nuevo con agua.
8. Revisar que el sistema de recirculación, filtración y desinfección del vaso funcionan correctamente, incluidos cualquier tipo de chorros o difusores, mientras el agua alcanza y mantiene el nivel de cloración requerido. En el caso de spas, todos los pulverizadores, aireadores, etc. deben estar funcionando durante todo el proceso.
9. Cualquier elemento móvil (suelos, elevadores, etc.) deben moverse siempre en todo el proceso.

Protocolos de tratamiento

En función de las características de la piscina (sistema de filtración y del tiempo de recirculación necesario), se podrá adoptar el método que sea más adecuado para la eliminación de los ooquistes de *Cryptosporidium*: hipercloración o filtración-floculación.

1. Protocolo de hipercloración

Indicado para sistemas de depuración con filtros de tasa o velocidad de filtración alta (25–50 $m^3/h/m^2$).

El gestor debe asegurarse de que toda la estructura del vaso soportará el tratamiento (válvulas, sellado), aislando los controles de dosificación automática para evitar daños en los sensores. En el caso de spas, todos los pulverizadores, aireadores, etc. deben estar funcionando durante todo el proceso.

Las acciones por realizar son las siguientes:

<u>En el caso de heces sólidas:</u>

- Desconectar el sistema de desinfección automática del circuito del agua para evitar daños en las sondas.
- Elevar el nivel de cloro libre residual en el agua a más de 2 mg/L y ajustar el pH en 7,2–7,5.
- Revisar el sistema de recirculación y filtración de la piscina, asegurándose de que todo el sistema funcione correctamente durante el proceso (incluidos chorros y difusores).
- Mantener este nivel con la piscina cerrada, durante 30 min como mínimo. El tiempo de desinfección puede ser disminuido aumentando el nivel de cloro libre residual, siempre y cuando sean normalizados los valores de forma previa a su uso.
- Comprobar el nivel de cloro libre 15 min después de la cloración inicial para asegurarse de que la correcta concentración ha sido alcanzada; para una correcta medición puede ser necesario diluir la muestra con agua no clorada.
- Dejar el tiempo de contacto necesario. Si es preciso, redosificar para mantener el nivel requerido de cloro residual comprobando el pH.

<u>En el caso de vómitos y/o heces líquidas:</u>

- Elevar el nivel de cloro libre residual en el agua como se requiera para manejar el problema: hiperclorar hasta 20 mg/L y ajustar el pH en 7,2–7,5.

  Mantener como mínimo este nivel durante 13 h, realizando los controles necesarios, con las diluciones que se precisen para su lectura, al menos cada dos horas, para asegurar que se mantiene la concentración. El tiempo de desinfección puede ser disminuido hasta 7 h, (aumentando el nivel de cloro libre residual a 40 mg/L y un pH entre 7,2–7,5.) o incluso hasta 5 h (50 mg/L durante 5 h).

  Alternativamente cualquier valor de CT superior a 9 600 ([mg/L de cloro] x [min de contacto]) puede ser válido.
- Comprobar el nivel de cloro libre 15 min después de la cloración inicial para asegurarse de que la correcta concentración ha sido alcanzada; para una correcta medición puede ser necesario diluir la muestra con agua no clorada.
- Dejar el tiempo de contacto necesario. Mantener el nivel requerido de cloro residual, comprobando el pH.

- Proceder a la neutralización o reducción hasta valores normales, mediante tiosulfato sódico pentahidratado.

Piscinas sin filtración (vasos llenos y vacíos)

Para cualquier piscina, existe la posibilidad de ser vaciada totalmente, si los gestores tienen la certeza de poder realizarlo de forma segura.

Siguiendo las indicaciones de los anteriores protocolos, el procedimiento a seguir sería el siguiente:

- Cierre del vaso y cualquier otro cuyo tratamiento del agua, esté unido al del vaso en cuestión.
- Hiperclorar (hasta 20 mg/L durante 13 h o 50 mg/L durante 5 h).
- Aspirar y barrer la piscina.
- Drenar, aclarar y rellenar.
- Volver a tratar y cuando los niveles de desinfectante residual y de pH sean normales, reabrir el vaso.

2. Protocolo de filtración-floculación.

Indicado para sistemas de depuración con filtros de tasa o velocidad de filtración media (hasta 25 $m^3/h/m^2$).

1. Mantener el nivel de desinfectante residual en el agua, en el máximo posible de su rango para ese vaso (por ejemplo 2,0 mg/L de cloro libre si su intervalo está entre 0,5 y 2,0 mg/L) y el valor de pH en el valor más bajo de su intervalo (por ejemplo, pH 7,2–8,0). Esto mantendrá el nivel habitual de protección microbiana.
2. Revisar el sistema de recirculación y filtración de la piscina, asegurándose de que todo el sistema funcione correctamente.
3. Añadir un floculante en cantidad suficiente según cada instalación siguiendo las instrucciones del fabricante y de forma continuada, según las instrucciones del fabricante.
4. Iniciar el proceso de filtración durante 6 ciclos completos de renovación. Esto puede suponer el cierre de la piscina durante más de 24 h. Para el cálculo del tiempo total de filtración requerido:

$$Tiempo\ de\ filtración\ (h) = \frac{Volumen\ de\ la\ piscina\ (m^3)}{Caudal\ de\ la\ depuradora\ (\frac{m^3}{h})}\ x\ 6$$

   En el caso de filtros de precapa y de filtros de medio regenerativo, tras efectuar los 6 ciclos de renovación, el medio ha de ser desechado.

5. Comprobar de forma periódica que el nivel de cloro libre residual y el pH son correctos durante todo el tiempo de filtración.

Actuaciones post tratamiento

1. Pasar la aspiradora / barredera por todo el fondo y las paredes del vaso de la piscina y eliminar el agua aspirada al alcantarillado. Al finalizar, se debe desinfectar la aspiradora y cualquier utensilio que se haya usado. El equipo de limpieza (incluso los automáticos) ha de ser desinfectado tras su uso, evitando así una recontaminación del agua de la piscina.
2. Antes de reanudar la filtración, aclarar y limpiar a contracorriente los filtros de la depuradora de forma repetida, mientras se hace la recirculación, vertiendo el agua utilizada al alcantarillado para que no retorne al vaso. Si fuera necesario, se sustituirá también el elemento o material filtrante (arena, cristal, etc.).

3. Comprobar que la planta de tratamiento del vaso funciona correctamente (filtros, circulación, desinfección).
4. Completar el volumen de la piscina hasta el nivel de agua requerido. Antes de conectar todo el sistema de filtración, circular sin filtrar el agua durante un tiempo para eliminar cualquier contaminación residual de ooquistes en la piscina y permitir madurar el filtro (mínimo 10 min; hasta 8 h tras un tratamiento de coagulación).
5. Asegurar que se mantienen los niveles de cloro y pH en valores normales de uso (0,5–2 mg/L) que permitan la reapertura de la piscina al público. Conectar el sistema de dosificación de cloro y pH.
6. Registrar de forma escrita el incidente y las medidas adoptadas para su subsanación, describiendo las actuaciones y operaciones realizadas, incluidos los niveles de cloro, pH y tiempos registrados durante el proceso (desalojo, cada etapa de tratamiento, acciones complementarias, etc.).
7. Incluir en el autocontrol de la instalación las medidas preventivas para evitar que se vuelva a producir, así como un protocolo de actuación ante accidentes de este tipo.
8. Revisar las indicaciones al público, reflejadas al respecto en las normas de régimen interno dirigidas a los usuarios, a fin de minimizar el aporte de contaminación al vaso (el uso del vaso de chapoteo y el uso de pañal para los niños pequeños; no tomar el baño si se padece diarrea). Incluir in situ, si fuera preciso, carteles, pictogramas, etc.

Escenario 2: Detección de *Cryptosporidium* o notificación de caso o brote de *Cryptosporidium* asociado a la instalación

Ante la declaración de un caso o brote por *Cryptosporidium* por dos o más casos de criptosporidiosis que tengan una relación epidemiológica asociada con el uso de aguas recreativas de una instalación acuática, las indicaciones sanitarias para dirigir la intervención de los equipos de salud pública son:

1) Cerrar el/los vasos a los bañistas y no permitir que nadie entre hasta completar una desinfección efectiva de el/los vasos afectados (se deben tratar aquellos vasos donde se haya asociado el baño de los casos reportados y todas aquellas instalaciones que estén conectadas):
   a) Tratamiento de desinfección efectiva. Con el objetivo de inactivar *Cryptosporidium*, se debe realizar un tratamiento de hipercloración con una dosis CT de 15 300 mg x min/L, para ello los pasos a seguir son:
      i) Utilizando hipoclorito sódico, aumentar la concentración de cloro libre hasta obtener 20 mg/L manteniendo el pH entre 7,2–7,5 durante 13 horas. Mientras se realiza la desinfección, el sistema de depuración estará funcionando.
      ii) Lavar el filtro minuciosamente después de alcanzar el valor CT de inactivación. El agua de lavado se llevará a desagüe. Cuando sea necesario se deberá cambiar el medio filtrante.
      iii) Neutralizar el cloro residual libre y ajustar los valores de cloro y pH antes de la puesta en marcha.
   b) Limpiar y desinfectar los aseos y vestuarios y el mobiliario, duchas, etc., cercanos a los vasos.
2) Revisar si la instalación tiene las medidas preventivas adecuadas para evitar futuros brotes. Los aspectos por revisar son:
      i) Disponer de los mensajes de higiene para los bañistas en los vestuarios y zonas de baño.
      ii) Tener protocolos en caso de accidente fecal y de detección de *Cryptosporidium* o casos o brotes de criptosporidiosis.

iii) Tener un tratamiento del agua que asegure el cumplimento de la normativa vigente en materia de requisitos sanitarios de las piscinas, incluyendo un buen mantenimiento de los sistemas de filtración.

Todas las actuaciones realizadas deben quedar reflejadas en el programa de autocontrol.

NOTA SOBRE BROTE INACTIVO. En una situación en la cual el caso o brote no esté activo, es decir, han transcurrido semanas entre la infección y la notificación del último caso, se valorarán y adaptarán las acciones a realizar en cada caso.

6. Procedimiento para la detección y recuento de ooquistes de Cryptosporidium en aguas de consumo humano y piscinas

7.1. Principio de procedimiento

7.2. Recogida de la muestra de agua

1. **Filtración *in situ***
2. **Transporte y conservación**
3. **Filtración en el laboratorio**

7.3. Equipos, materiales, diluyentes y reactivos

1. **Equipos**
2. **Materiales**
3. **Diluyentes**
4. **Reactivos**

7.4. Procedimiento

1. **Concentración**
2. **Separación inmunomagnética**
3. **Inmunofluorescencia directa**
4. **Identificación y enumeración de ooquistes de *Cryptosporidium***

7.5. Tratamiento y expresión de resultados

7.6. Control de calidad

1. **Preparación del inóculo para la realización de infecciones experimentales**
2. **Cálculo del porcentaje de recuperación del procedimiento**

7.7. Métodos alternativos

Este procedimiento ha sido realizado en base a la revisión de los siguientes protocolos estandarizados:

A. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. Quick Guide to Drinking Water Sample Collection. United States Environmental Protection Agency. Disponible en https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OW-2018-0826-0061.

B. ISO 15553:2006: Water quality. Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. Disponible en https://www.iso.org/standard/39804.html.

C. The Microbiology of Drinking Water (2010) - Part 14 - Methods for the isolation, identification and enumeration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. Disponible en https://www.gov.uk/government/publications/standing-committee-of-analysts-sca-blue-books.

6.1. Principio del procedimiento

El procedimiento descrito a continuación sólo permite la identificación morfológica y enumeración de ooquistes de *Cryptosporidium* a nivel de género. La identificación de especie y genotipo requeriría la realización de técnicas moleculares complementarias. Tampoco permite determinar la viabilidad o infectividad de los ooquistes detectados. Este procedimiento consta de 3 fases:

i. **Concentración**. El aislamiento de ooquistes de *Cryptosporidium* a partir de matrices acuáticas requiere el uso de un método que permita concentrar en un pequeño volumen los microorganismos presentes en la muestra. La técnica descrita es la de filtración a través de un cartucho/cápsula con un tamaño de poro nominal de 1 µm que retiene los ooquistes de *Cryptosporidium* (cuyo tamaño es de 4–6 µm), seguido de una elución y una centrifugación a baja velocidad.

ii. **Purificación**. Después de la concentración mediante filtración se procede a la purificación de los ooquistes de *Cryptosporidium* mediante separación inmunomagnética. Esta tecnología se basa en el uso de partículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos contra proteínas de la pared del ooquiste. Las partículas se retiran del material no deseado mediante lavados sucesivos utilizando una gradilla magnética. Finalmente, los ooquistes son disociados de las partículas paramagnéticas usando una solución ácida que deberá neutralizarse.

iii. **Detección y enumeración**. A partir de la suspensión de ooquistes purificados obtenidos en el paso anterior se realiza una inmunofluorescencia directa utilizando anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína (FITC). Adicionalmente, para ayudar en la identificación, se realiza una tinción con una solución de diamidino-phenylindol (DAPI), un agente intercalante del ADN que tiñe de azul los núcleos de los ooquistes del parásito. Cada muestra se examina en un microscopio de epifluorescencia para confirmar la presencia y número de ooquistes de *Cryptosporidium*.

6.2. Recogida de la muestra de agua

La recogida de la muestra de agua es un factor crítico que va a determinar en gran medida la fiabilidad y robustez de los resultados finales del procedimiento. Antes de realizar el muestreo es necesario realizar una valoración objetiva de los siguientes factores:

i. La turbidez (es decir, la concentración de partículas en suspensión) de la fuente original de agua a muestrear. En general, las aguas superficiales no tratadas (por ejemplo, ríos, pantanos, embalses) presentan turbideces muy superiores a las aguas tratadas (por ejemplo, agua de red, aguas recreativas), sobre todo después de eventos climatológicos adversos como lluvias intensas.

ii. El tipo de filtro o cápsula disponible para la concentración de ooquistes del parásito. Existen diferentes tipos de filtros/cápsulas disponibles comercialmente con diferentes especificaciones, rendimientos y costes (Figura 2). En principio, todos ellos pueden ser efectivos siempre y cuando se realicen los estudios de validación necesarios.

iii. El volumen de agua a filtrar. Este valor va a depender tanto de la turbidez inicial del agua como del sistema de filtración utilizado. De modo general, muestras de agua con elevadas turbideces tienden a colmatar antes los filtros/cápsulas que las muestras con baja turbidez. De igual modo, los sistemas basados en cartuchos (por ejemplo, 3M™ CUNO™) admiten mayores rangos de turbidez que los basados en cápsulas (por ejemplo, Envirochek® HV o Filtra-Max® Foam Filter). Sin embargo, los sistemas basados en cápsulas suelen tener una mayor capacidad de retención (y por lo tanto una mayor sensibilidad diagnóstica) que los sistemas basados en cartuchos.

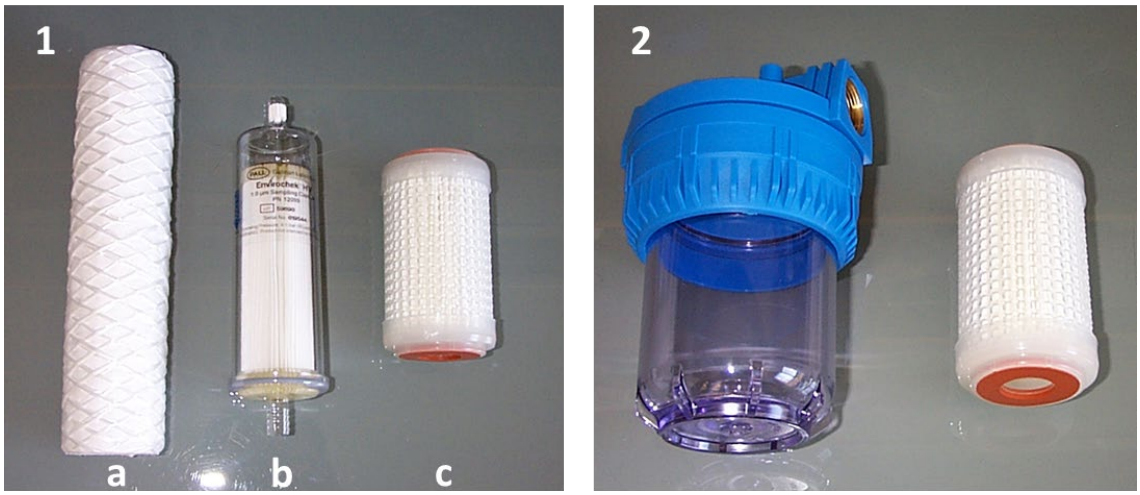


***Figura 2**. Panel 1. Tipos de cartuchos y cápsulas disponibles comercialmente para el filtrado de muestras de agua. a) 3M™ CUNO™; b) Envirochek® HV; c) Filtro Corning. Panel 2. Filtro Corning con su correspondiente portafiltros. Fuente: cortesía David Carmena*

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, y a modo de referencia, en la Tabla 11 se indican los volúmenes de agua a procesar en el procedimiento en función del tipo de muestra inicial.

***Tabla 11**. Rango de volúmenes de agua recomendado para la detección y recuento de ooquistes de Cryptosporidium en función del tipo de muestra*

Tipo de muestra	Volumen (litros)
Agua de consumo tratada (red de abastecimiento)	10–1 000[1]
Aguas que han pasado por un proceso de filtración y que son el resultado final del tratamiento, antes de su uso o consumo	10–1 000
Aguas procedentes del lavado de filtros	10–1 000
Aguas superficiales con baja turbidez	1–10[2]
Aguas superficiales	10–100[2]
Aguas subterráneas	10–50[2]
Agua de piscina	10–1 000[2]
Efluentes de aguas residuales tratadas	100–1 000[2]
Aguas residuales no sometidas a tratamientos	10–20
Muestras sólidas (por ejemplo, sedimentos de filtros)	1–5[3]

[1]La toma de volúmenes pequeños puede facilitar la gestión de situaciones de brote donde se requieren resultados rápidamente para ayudar en la toma de decisiones.

[2]Dependiendo de la turbidez de la muestra.

[3]Cantidad en gramos.

Fuente: The Microbiology of Drinking Water (2010) - Part 14 - Methods for the isolation, identification and enumeration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts.

6.2.1 Filtración *in situ*

La filtración *in situ* debe ser priorizada siempre que sea logísticamente posible, ya que es el procedimiento más eficiente para la retención de ooquistes de *Cryptosporidium* en los filtros/cápsulas utilizadas. Es la única opción disponible cuando los volúmenes a filtrar son ≥100 litros. El principal inconveniente de este protocolo es que requiere un equipo de muestreo específico (Figura 3) que debe incluir:

- Bomba peristáltica con regulador de flujo variable conectado a una manguera de entrada.
- Manómetros para medir la presión del agua a la entrada y la salida del portafiltros.
- Portafiltros conectado a una manguera de salida.
- Caudalímetro para medir el volumen de agua filtrado.
- Grupo electrógeno portátil para el suministro de energía eléctrica necesaria para operar la bomba peristáltica.

***Figura 3**. Panel 1. Equipo estándar para la filtración in situ de muestras de agua. Panel 2. Vista superior de la maleta portátil incluyendo manguera de entrada al circuito con llave para el control de flujo, bomba peristáltica, manómetro 1, manguera de entrada al portafiltros, manguera de salida del portafiltros, manómetro 2, caudalímetro y manguera de salida del sistema. Las flechas amarillas indican el flujo del agua a través del sistema. Panel 3. Punto de muestreo típico de aguas superficiales. Panel 4. Equipo de muestreo operando en condiciones de campo. Fuente: cortesía David Carmena*

El sistema debe ser operado bajo las condiciones de flujo y presión específicas para el tipo de filtro/cápsula utilizada, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El flujo puede ser controlado manipulando la llave de entrada normalmente situada en la manguera de entrada al sistema. Se debe realizar un registro meticuloso de las lecturas del caudalímetro antes y después del procedimiento para precisar el volumen de agua filtrada. Los manómetros situados antes y después del portafiltros pueden ser útiles para identificar variaciones significativas de presión indicativas de colmatación del filtro por exceso de turbidez de la muestra. En estos casos es recomendable: i) finalizar el proceso de filtración o ii) reemplazar el filtro/cápsula en uso por uno/a nuevo/a si no se ha alcanzado el volumen de filtración necesario.

6.2.2 Transporte y conservación

- Los filtros/cápsulas deben ser transportados/as al laboratorio en oscuridad y a temperatura ambiente para su posterior procesamiento y análisis.
- Una vez en el laboratorio deben ser conservados/as a 5±3 °C si no se van a procesar inmediatamente.

- Idealmente los filtros/cápsulas deben ser analizados/as dentro de las 24 h tras la toma de muestras y nunca más tarde de 4 días.
- Si los filtros/cápsulas han sido mantenidos/as en refrigeración a 5±3 °C, deben atemperarse a temperatura ambiente antes de su procesamiento.

6.2.3 Filtración en el laboratorio

Este procedimiento debe ser considerado en caso de no disponer del equipamiento o la logística necesarios para realizar filtraciones *in situ*. Puede ser una opción coste-efectiva con muestras de agua de turbidez media-alta y volúmenes de 5–100 litros. Sin embargo, tiene el inconveniente de que los posibles ooquistes de *Cryptosporidium* presentes en la muestra pueden adherirse a la pared del bidón o formar agrupaciones (*clusters*) que dificultan su filtración y disminuyen el rendimiento de la técnica. Por estos motivos es importante procesar la muestra dentro de las 24–48 h tras su recogida.

Figura 4. *Filtración en el laboratorio de una muestra de agua transportada en un bidón de 50 litros. Fuente: cortesía David Carmena*

Indicaciones para la toma de la muestra:

- Se pueden utilizar bidones de polietileno limpios.
- El bidón debe ser enjuagado con el agua de la que se va a tomar la muestra.
- Los bidones deben llenarse completamente para asegurar que se recoge el volumen requerido.
- Las condiciones de transporte y conservación son las mismas que las indicadas anteriormente para el procedimiento de filtración *in situ*.

6.3. Equipos, materiales, diluyentes y reactivos

6.3.1 Equipos

- Cápsulas de filtración Envirocheck® HV (Cytiva, Amersham, Reino Unido). En caso de utilizar otro/a filtro/cápsula comercial, éste/a debe ser convenientemente validado/a para demostrar que su rendimiento diagnóstico es adecuado.
- Bomba peristáltica con regulación de flujo.
- Agitador mecánico para cápsulas Envirocheck® HV (Cytiva, Amersham, Reino Unido).
- Mechero de gas.
- Refrigerador de 4 °C.
- Congelador de –20 ± 5 °C.
- Cabina de flujo laminar de seguridad biológica.
- Pipetas automáticas de volumen variable.
- Centrífuga para tubos de 10–50 mL de rotor basculante.
- Dispositivo de aspiración regulable.
- Agitador tipo noria.
- Concentrador de partículas magnéticas Dynal MPC-1 (IDEXX Technologies, Newmarket, Reino Unido).
- Gradilla magnética para viales de 1,5 mL Dynal MPC-S (IDEXX Technologies, Newmarket, Reino Unido).
- Microscopio de epifluorescencia con filtro DAPI.
- Agitador tipo vórtex.
- Termómetro para el control de la temperatura de la sala.
- Equipos necesarios para la preparación de medios (balanza, pH-metro, autoclave etc.).

6.3.2 Materiales

- Material de laboratorio necesario para la preparación de medios (matraces, tubos, botellas, espátulas, etc.).
- Pipetas Pasteur estériles.
- Gomas autoclavables para la bomba peristáltica.
- Tubos cónicos de 50 mL para centrífuga.
- Tubos de lado plano Dynal (IDEXX Technologies, Newmarket, Reino Unido).
- Puntas estériles con filtro para micropipetas.
- Viales de 1,5 mL.
- Portaobjetos con pocillos de 6 a 9 mm de diámetro para inmunofluorescencia.

- Cubreobjetos.
- Cámara húmeda.
- Papel absorbente.

6.3.3 Diluyentes

- *Tampón para el pre-tratamiento del filtro previo a la elución*

Sodio de hexametafosfato	50 g
Agua desionizada estéril	1 000 mL

Preparación:

1. Disolver los 50 g en 600 mL de agua desionizada estéril.
2. Completar hasta 1 000 mL con agua desionizada estéril.

Una vez preparado se conservará a temperatura ambiente durante un periodo máximo de tres meses.

- *Tampón tris (1M pH 7,4)*

Tris	121,1 g
Agua desionizada estéril	1 000 mL

Preparación:

1. Disolver los 121,1g en 700 mL de agua desionizada estéril.
2. Ajustar el pH a 7,4 con HCl y/o NaOH.
3. Completar hasta 1 000 mL con agua desionizada estéril.

Una vez preparado se conservará a temperatura ambiente durante un periodo máximo de tres meses.

- *Solución EDTA sal disódica (0,5 M pH 8,0)*

EDTA sal disódica	186,1 g
Agua desionizada estéril	1 000 mL

Preparación:

1. Disolver los 186,1g en 800 mL de agua desionizada estéril.
2. Ajustar el pH a 8,0 con NaOH y/o con HCl para el ajuste final.
3. Completar hasta 1 000 mL con agua desionizada estéril.

Una vez preparada se conservará a temperatura ambiente durante un periodo máximo de tres meses.

- *Solución Laureth 12 al 10%*

Laureth 12	10 g

Agua desionizada estéril	90 mL

Preparación:

1. Disolver por calentamiento.
2. Distribuir en alícuotas a razón de 10 mL cada una, en tubos estériles.

Conservar a temperatura ambiente durante dos meses o durante un año en congelación.

- *Tampón de elución*

Laureth 12 al 10%	10 mL
Tampón Tris pH 7,4	10 mL
Solución de EDTA pH 8,0	2 mL
Antifoam A	150 µL
Agua desionizada estéril	1 000 mL

Preparación:

1. Añadir el contenido de un tubo de solución Laureth 12 al 10% a un envase estéril graduado de 1000 mL de capacidad. Enjuagar varias veces el tubo con agua destilada desionizada estéril para asegurar que todo el detergente ha sido transferido al envase.
2. Añadir el resto de los reactivos y completar hasta 1 000 mL con agua desionizada estéril.

Conservar a temperatura ambiente hasta dos meses.

Nota: El reactivo Tris-EDTA se puede adquirir comercialmente (Sigma T9285). En caso de utilizarse, se añadirían 10 mL del mismo para la preparación de 1 litro de tampón de elución.

6.3.4 Reactivos

- Agua desionizada estéril.
- Kit de separación y concentración inmunomagnética, que consta de:
  - Dynabeds anti-*Cryptosporidium* (IDEXX Technologies, Newmarket, Reino Unido).
  - Tampón A 10x. Para preparar Tampón A 1x: 100 µL de Tampón A 10x + 900 µL de agua desionizada estéril.
  - Tampón B 10x.
- Ooquistes de *Cryptosporidium* purificados EasySeed™ (BioPoint, Sydney, Australia).
- NaOH 1N y 6M.
- HCl 1 y 0,1 N.
- Tampón PBS: Solución de tampón fosfato pH 7,4 ± 0,2. Adquirido comercialmente, preparado según las indicaciones del fabricante. Se esteriliza en autoclave a 121 ± 3 °C.
- Laca de uñas.
- Kit de inmunofluorescencia directa EasyStain (BioPoint, Sydney, Australia) que incluye:
  - EasyStain conjugado: anticuerpos monoclonales anti-*Cryptosporidium* marcados con FITC.

- Control positivo.
- Solución BP DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol).
- Tampón de lavado.
- Medio de montaje.

- Metanol.
- Tween 20 al 0,05% (v/v): se prepara añadiendo a 100 mL de agua desionizada estéril (ADE) 50 µL de Tween 20.

6.4. Procedimiento

Lo ideal es procesar la muestra dentro de las 24 h transcurridas tras su recogida. Si esto no es posible, los tiempos máximos recomendados para las distintas fases del procesamiento de las muestras son los siguientes:

- Entre la recogida de la muestra/filtración y la elución puede transcurrir hasta cuatro días (96 h) conservándose en refrigeración. Antes de iniciar la elución, los filtros deben atemperarse a temperatura ambiente.
- Los pasos de elución, concentración, purificación y preparación de los portaobjetos con las muestras purificadas deben ser realizados en el mismo día.
- La tinción de los portaobjetos puede demorarse hasta tres días.
- El examen microscópico de los portaobjetos teñidos puede retrasarse hasta siete días.

6.4.1 Concentración

- *Filtración*

En esta etapa se hace pasar el volumen de agua necesario (ver Tabla 11) a través de un filtro o cápsula de policarbonato (en este protocolo se ha usado la cápsula Envirocheck® HV) que contiene una membrana de poliéster de un tamaño de poro nominal de 1 µm, laminada en un soporte de polipropileno, donde van a quedar retenidos los ooquistes de *Cryptosporidium*.

La filtración puede realizarse *in situ* o en muestras de agua transportadas al laboratorio en bidones. En ambos casos el procedimiento comienza con el ajuste del flujo de entrada de agua al sistema tal y como se indica a continuación:

- Conectar el sistema sin la cápsula a i) la fuente de agua superficial de origen (filtración *in situ*) o ii) un matraz o garrafa que contenga al menos 10 litros agua (filtración en el laboratorio).
- Encender la bomba, purgarla y ajustar el flujo a 2 litros/min.
- Permitir el flujo de 2–10 litros de agua por el sistema. Ajustar la velocidad de la bomba.
- Una vez ajustada apagar la bomba y proceder a conectar la cápsula para la filtración de manera que ésta se realice en el sentido indicado en la cápsula.

- Una vez finalizada la filtración, enjuagar el frasco que contenía la muestra con 1 litro de agua desionizada estéril y pasarlo nuevamente por la cápsula. Escurrir todas las gomas para recuperar al máximo la muestra y el líquido de lavado.
- Cerrar la cápsula colocando las tapas superior e inferior del mismo.

- *Elución*

Los ooquistes de *Cryptosporidium* y resto de partículas retenidos/as son separados/as de la membrana de la cápsula usando el tampón de elución. Este procedimiento se lleva a cabo en 2 pasos secuenciales:

a) Pre-tratamiento del filtro previo a la elución:

Para cada muestra se requieren aproximadamente de 125 a 150 mL de solución de sodio de hexametafosfato procediéndose de la siguiente manera:

- Mantener la cápsula en posición horizontal y con la válvula de purga blanca en posición horaria de 12 h (Figura 5).
- Retirar la tapa superior de la cápsula y abrir la válvula de purga blanca.
- Rellenar con el volumen necesario de tampón de hexametafosfato sódico de forma que a su nivel máximo quede aproximadamente la solución a 1 cm del orificio de entrada.
- Tapar la cápsula y cerrar la válvula de purga blanca.
- Colocar la cápsula en el agitador mecánico de brazos, con la válvula de purga blanca en posición horaria de 12 h (Figura 5) y mantener en agitación a 800 r.p.m. durante 5 min.

***Figura 5**. Vista frontal de la cápsula Envirocheck® HV en posición horizontal con la válvula de purga blanca (identificada con una flecha amarilla) en la posición horaria de 12 h. Fuente: cortesía Marisa Camaró Sala*

- Trascurrido este tiempo, abrir la tapa inferior de la cápsula y desechar el líquido. Volver a llenar la cápsula con agua desionizada estéril. Agitar por rotación durante 30 s para enjuagar la membrana.
- Quitar la tapa inferior y, en posición vertical, vaciar la cápsula y desechar el líquido.

b) Elución:

Se procederá de la siguiente manera:

- Rellenar la cápsula con el volumen de tampón de elución necesario (~140 mL) de forma que su nivel máximo quede aproximadamente a 1 cm del orificio de entrada, procediendo de la misma manera que se ha indicado en el apartado anterior.
- Colocar la cápsula al agitador de brazos y dejarlo en la posición horaria de 12 h durante 5 min a una velocidad de 800 r.p.m.
- Vaciar la cápsula por la parte superior lo suficiente como para rellenar los tubos de centrífuga de 50 mL necesarios, previamente identificados con el nº de muestra. Sacudir la cápsula para recoger el máximo volumen de tampón en los tubos.
- Rellenar de nuevo la cápsula con tampón de elución para iniciar un nuevo ciclo de elución, esta vez con la válvula de purga blanca en la posición horaria de 4 h durante 5 min a una velocidad de 800 r.p.m.
- Manteniendo el tampón de elución en el interior de la cápsula, rotar la cápsula cambiamos la posición a las 8h y agitamos de nuevo en las mismas condiciones.
- Recoger el tampón de elución en otros tantos tubos de centrífuga de 50 mL, identificándolos con el número de muestra. Volver a tapar la cápsula y sacudirlo para acabar de recoger el tampón.

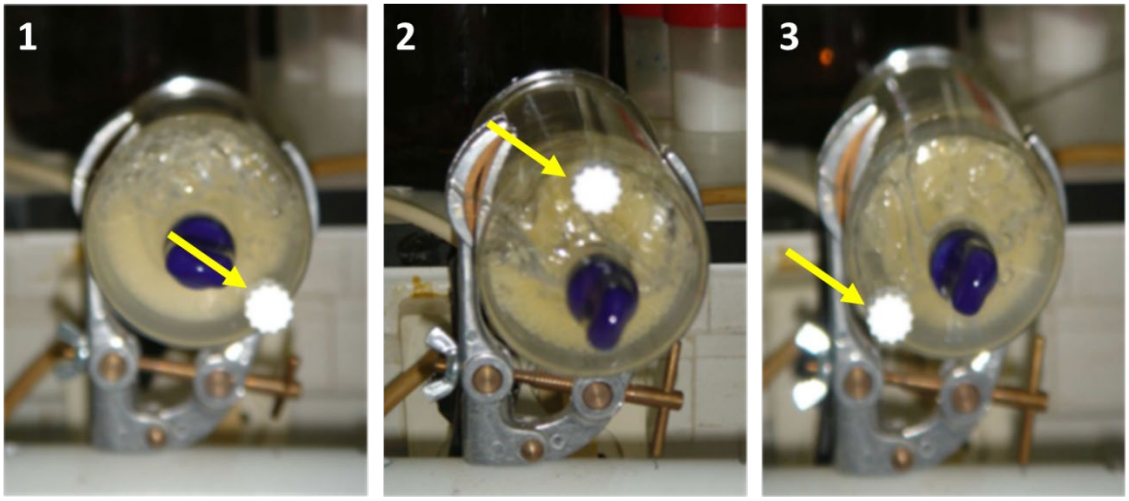


***Figura 6**. Vista frontal de la cápsula Envirocheck® HV en posición horizontal con la válvula de purga blanca (identificada con una flecha amarilla) en la posición horaria de 4 h (panel 1), 12 h (panel 2) y 8 h (panel 3). Fuente: cortesía Marisa Camaró Sala.*

- *Centrifugación*

Este paso tiene como objeto la concentración de los ooquistes de *Cryptosporidium* eluídos de la membrana de la cápsula. Se procederá de la siguiente manera:

- Colocar los tubos de 50 mL en la centrífuga de manera que la banda blanca esté hacia el eje del rotor.
- Centrifugar a 1 100 g durante 16 min, con la aceleración máxima y sin utilizar el freno.
- Eliminar el sobrenadante de los tubos con el dispositivo de aspiración regulable, de manera que la punta de la pipeta aspire en la parte superior, sin llegar nunca al final del tubo para evitar

eliminar los quistes/ooquistes sedimentados, dejando 5 mL de líquido en cada uno de ellos.

- Agitar en vórtex los 5 mL (volver a vortear el tubo vacío) y recoger en un único tubo de 50 mL (aproximadamente 30 mL).
- Centrifugar de nuevo a 1 100 g durante 16 min, con los tubos en la misma disposición, aceleración máxima y sin utilizar el freno.
- Eliminar el sobrenadante tal y como se ha indicado anteriormente dejando de nuevo 5 mL de líquido en cada tubo.
- Observar, si hay sedimento, que éste no sea superior a 0,5 mL.
- Agitar en vórtex, recoger los 5 mL con el sedimento resuspendido y transferirlos a un tubo plano de 10 mL al que previamente se le habrá añadido 1 mL del tampón A 10x y 1 mL del tampón B 10x previamente atemperados.
- Añadir 2,5 mL de ADE al tubo cónico de centrífuga y lavar bien antes de transferirlos al tubo de lado plano. Repetir el lavado con otros 2,5 mL de ADE para obtener un volumen final de 10 mL.
- Si el sedimento es mayor de 0,5 mL, calcular el volumen total de agua desionizada estéril que habría que añadir utilizando la siguiente fórmula:

$$Volumen\ a\ añadir\ (mL) = \frac{Pellet\ volumen}{0{,}5\ ml} . 10\ mL$$

6.4.2 Separación inmunomagnética

En este paso se produce la captura y purificación de los ooquistes de *Cryptosporidium* para separarlos del resto de material particulado de la muestra. Se procederá de la siguiente manera:

- Vortear durante 10 s las partículas magnéticas Dynabeads anti-*Cryptosporidium* y resuspender por inversión del vial varias veces.
- Añadir 100 µL de las partículas resuspendidas al tubo de lado plano. El volumen final en el mismo debe ser de 12,2 mL.
- Colocar los tubos de lado plano en un rotor tipo noria con la suficiente inclinación hacia el eje para que la muestra oscile entre el tapón y la base del tubo (Figura 7). Incubar durante 1 h a temperatura ambiente y una velocidad de 18 r.p.m.

***Figura 7**. Separación inmunomagnética en tubos de lado plano incubados en un rotor tipo noria. Fuente: cortesía Marisa Camaró Sala*

- Colocar los tubos en el concentrador de partículas magnéticas Dynal MPC-1 con el lado plano del tubo junto al imán y el tapón ligeramente aflojado.
- Mover el concentrador en ángulo de 90º durante unos 2 min, de forma que el líquido se mueva del tapón a la base y viceversa, permitiendo que las partículas magnéticas se dispongan longitudinalmente en el surco central del tubo (Figura 8).
- Sin quitar el tubo del concentrador, quitar el tapón y eliminar el sobrenadante por decantación. Eliminar el sobrenadante remanente poniendo en contacto la boca del tubo con papel absorbente (Figura 8).

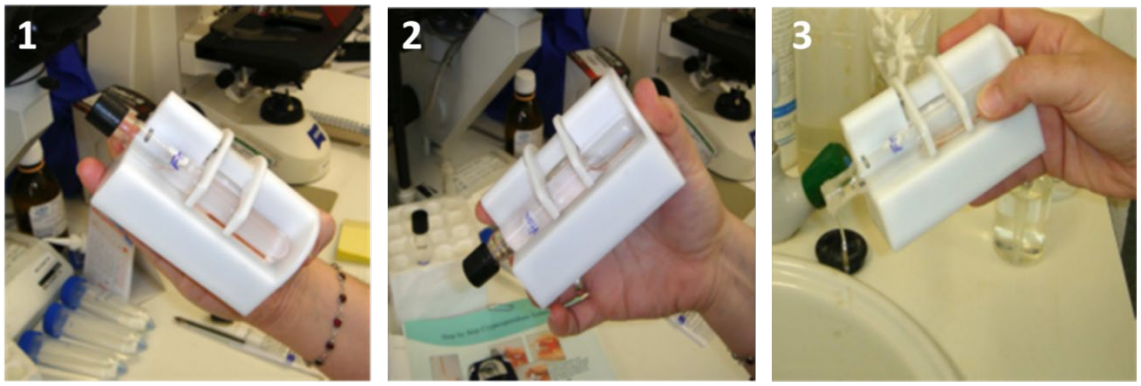


***Figura 8**. Uso del concentrador de partículas magnéticas Dynal MPC-1. Panel 1: Colocación del tubo de lado plano en el concentrador; Panel 2: Inversión de 90º; Panel 3: Descarte del sobrenadante por decantación. Fuente: cortesía Marisa Camaró Sala*

- Preparar el tampón A (previamente atemperado a temperatura ambiente) diluido 1/10.
- Quitar el tubo del concentrador y añadir 400 µL del tampón A diluido 1/10. Mezclar suavemente para resuspender todo el material del tubo.

- Transferir el material resuspendido a un tubo Eppendorf de 1,5 mL limpio rotulado con el número de muestra (Figura 9). Para este paso se debe usar una pipeta Pasteur de vidrio previamente humedecida en el mismo tampón.
- Repetir dos veces más el proceso de lavado con tampón A tal y como se ha indicado anteriormente.
- Colocar los tubos Eppendorf en la gradilla magnética Dynal MPC-S.

***Figura 9**. Transferencia de las partículas magnéticas aisladas en el concentrador Dynal MPC-1 a viales de 1,5 mL para su posterior lavado en la gradilla magnética Dynal MPC-S. Fuente: cortesía Marisa Camaró Sala*

- Proceder a la inversión de la gradilla con giros sucesivos de 180º. Se observa la formación de una banda oscura en la pared del vial en contacto con el imán de la gradilla donde se concentran las partículas magnéticas Dynabeads anti-*Cryptosporidium*.
- Manteniendo los tubos en la gradilla magnética, aspirar inmediatamente el sobrenadante y los restos que queden en la tapa del tubo Eppendorf con la ayuda de una pipeta de volumen variable y punta estéril o una pipeta Pasteur estéril. Evitar entrar en contacto con las partículas magnéticas retenidas en la pared lateral del tubo.
- Para disociar los posibles ooquistes de *Cryptosporidium* unidos a las partículas magnéticas, retirar la banda magnética de la gradilla y añadir 50 µL de HCl 0,1 N a cada tubo Eppendorf. Agitar en vórtex durante 10 s.
- Incubar los tubos en posición vertical durante 10 min a temperatura ambiente.
- Agitar en vórtex durante 10 s, asegurándose que toda la muestra está en el fondo cónico del tubo.
- Colocar de nuevo la tira magnética en la gradilla y dejar reposar en posición vertical a temperatura ambiente durante unos 10 s en reposo.
- Un segundo paso de disociación procediendo como se ha indicado anteriormente puede aumentar el número de ooquistes de *Cryptosporidium* recuperados en muestras en las que se sospeche que éstos se encuentran en escasa concentración.

- Añadir a cada pocillo del portaobjetos 5 µl de NaOH 1 N y mezclar con los 50 µL de la muestra para su neutralización. Para ello, ajustar la pipeta con un volumen ligeramente superior a 50 µL para asegurarse de recoger toda la muestra y evitar la alteración de partículas magnéticas Dynabeads anti-*Cryptosporidium*. Rotular cada portaobjetos con el nº de muestra.

6.4.3 Inmunofluorescencia directa

- Colocar sobre un pocillo 50 µL del control positivo facilitado en el kit.
- Si la tinción se va a realizar inmediatamente, colocar el portaobjetos sobre una gradilla e incubar en estufa a 37 °C durante 1 h como máximo para su secado. Alternativamente, el portaobjetos también se puede secar durante toda la noche en refrigeración a 4 °C (descubierto) o a temperatura ambiente (parcialmente cubierto). El secado del portaobjetos no debe realizarse en una cámara fría con humedad ambiental.
- En el caso de que tuviera que demorarse la tinción por inmunofluorescencia, el portaobjetos seco se guardará en refrigeración a 4 °C.
- Fijar los pocillos añadiendo 50 µL de metanol. Dejar secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min. Este paso es opcional, pero puede mejorar la calidad de la tinción DAPI.
- Añadir a cada pocillo 1–2 gotas (50 µL) de solución BP DAPI. Homogeneizar inclinando manualmente el portaobjetos de manera circular. Minimizar el contacto con luz natural, ya que la solución DAPI es fotosensible. Incubar durante 2 min en reposo.
- Retirar el exceso de reactivo mediante papel absorbente, inclinando el portaobjetos y sin tocar el interior del pocillo del portaobjetos. Alternativamente, este paso también puede ser realizado mediante aspiración inclinando el portaobjetos y evitando tocar la superficie del mismo con la punta de la pipeta para evitar la alteración de la muestra fijada (Figura 10).

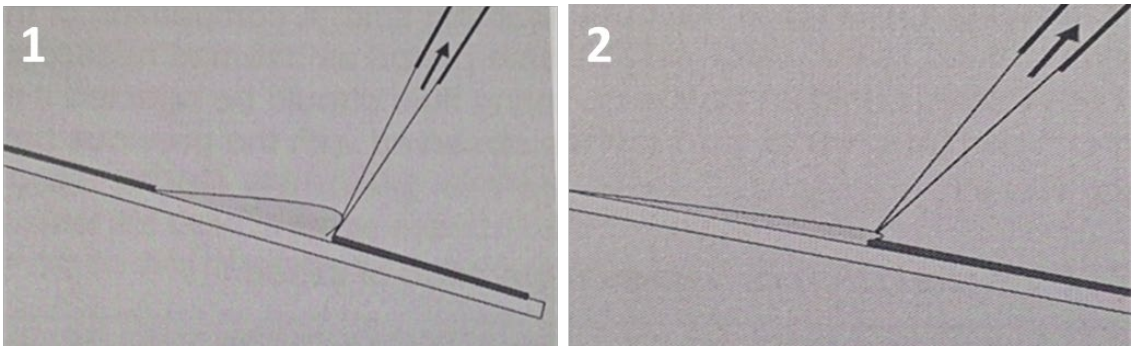


***Figura 10**. Eliminación del exceso de tinción en un portaobjetos de pocillos excavados. Panel 1: Inclinación del portaobjetos en ángulo de 45° para facilitar el proceso de pipeteo. Panel 2: colocando la punta de la pipeta en el borde del pocillo (sin tocar el fondo del mismo) se absorbe el exceso de tinción cuidadosamente. Fuente: cortesía Marisa Camaró Sala*

- Lavar los pocillos del portaobjetos añadiendo 50 µL de agua destilada, homogeneizar inclinando manualmente el portaobjetos de manera circular e incubar durante 1 min en reposo.
- Eliminar el exceso de agua como se ha indicado anteriormente.
- Añadir 50 µL de tinción EasyStain a cada pocillo, homogeneizar inclinando manualmente el portaobjetos de manera circular e incubar a temperatura ambiente durante 30 min o en cámara

húmeda a 37 °C durante 15 min.

- Eliminar el exceso de reactivo como se ha indicado anteriormente.
- Añadir 100 µL del tampón de lavado proporcionado por el kit a cada pocillo, homogeneizar y retirar. Repetir este paso una segunda vez. Es crítico que este reactivo esté frío a la hora de añadirlo; por lo tanto, se tomará directamente del frigorífico o se mantendrá en hielo durante su uso.
- Eliminar el exceso de reactivo como se ha indicado anteriormente.
- Añadir 5µL de solución de montaje a cada cubreobjetos y colocarlo encima del pocillo correspondiente del portaobjetos. No deben ser usadas soluciones de montaje diferentes a las incluidas en el kit.
- Sellar con una gota de laca de uñas las 4 esquinas del cubreobjetos y unirla para evitar su desplazamiento sobre el portaobjetos.
- Examinar al microscopio de epifluorescencia.

Nota 1: Con cada serie de muestras teñidas se debe incluir el control positivo proporcionado por el kit, que deberá ser procesado de la misma manera que una muestra ordinaria.

Nota 2: La tinción con DAPI se puede realizar después de la tinción con EasyStain.

6.4.4 Identificación y enumeración de ooquistes de *Cryptosporidium*

Se realiza mediante la observación de los portaobjetos en un microscopio de epifluorescencia con un sistema de filtros para las tinciones FITC (excitación: 480 nm; emisión: 520 nm) y DAPI (excitación: 350 nm; emisión: 450 nm).

El examen de la preparación se inicia observando el control positivo a 400x aumentos para confirmar que los ooquistes de *Cryptosporidium* han sido correctamente teñidos con los anticuerpos monoclonales conjugados con FITC.

Repetir este examen a 1 000x con el filtro correspondiente para confirmar que el material nuclear ha sido correctamente teñido con DAPI.

Si el control positivo es correcto, proceder a la lectura de las muestras utilizando un sistema de exploración sistemático de arriba abajo o de lado a lado hasta que se haya observado el pocillo en su totalidad.

La morfología de los ooquistes de *Cryptosporidium* debe cumplir los siguientes criterios en la tinción FITC (Figura 11):

- Emisión de una fluorescencia verde manzana (bordes brillantes).
- Forma esférica o ligeramente ovoide (algunos con divisiones o líneas de sutura).
- Diámetro de 4–6 µm.

Con la tinción DAPI, el núcleo de los ooquistes de *Cryptosporidium* aparecerá de color azul cielo al ser examinados en el microscopio de fluorescencia con el objetivo de inmersión a 100x.

La morfología de los ooquistes de *Cryptosporidium* debe cumplir los siguientes criterios en la tinción DAPI (Figura 11):

- De dos a cuatro núcleos de color azul cielo dentro de un mismo ooquiste.

- Material nuclear que puede ser ligeramente difuso dando un aspecto irregular o borroso.
- Los ooquistes con tinción azul difusa y estructuras nucleares no claramente identificadas no deben ser considerados en el recuento.

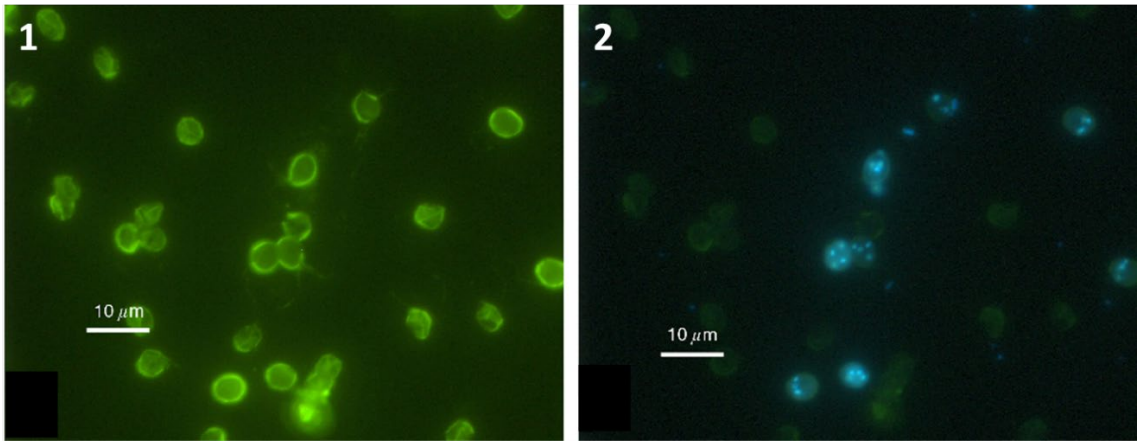


***Figura 11**. Ooquistes de Cryptosporidium. Panel 1: Imagen de microscopía de inmunofluorescencia. Panel 2: Imagen de microscopía de inmunofluorescencia con tinción DAPI. Fuente: H.D.A Lindquist, Agencia de Protección Ambiental de E.E. U.U (USEPA)*

6.5. Tratamiento y expresión de resultados

El resultado se expresará teniendo en cuenta los siguientes factores:

- La muestra obtenida tras la concentración y separación inmunomagnética debe ser examinada en su totalidad.
- Se debe registrar el número de ooquistes de *Cryptosporidium* por volumen de muestra examinada, incluyendo un factor de corrección que considere el porcentaje de recuperación del procedimiento
- La ausencia de ooquistes en la muestra deberá ser expresada como "No se detecta" en el volumen de muestra examinado.

6.6. Control de calidad

Para el control de calidad del procedimiento se realizarán las siguientes verificaciones:

- Control negativo del proceso (CNP): consiste en 1 litro de agua destilada estéril que se procesará como una muestra independiente.
- Control positivo de la muestra (CPP-M): consiste en una muestra real de 10 litros de agua inoculada experimentalmente con 100–500 ooquistes purificados de *Cryptosporidium* y que se procesará como una muestra independiente.
- Control positivo de la muestra (CPP-MD). Muestra duplicada: consiste en una muestra real de 10 litros inoculada experimentalmente de la misma manera que la anterior, y que se procesará como una

muestra independiente.

- Blanco de la muestra (BM): consiste en 10 litros de la misma muestra real del apartado anterior, pero sin adición de ooquistes de *Cryptosporidium* y que constituye el blanco de esta. Se procesará como una muestra independiente.

6.6.1 Preparación del inóculo para la realización de infecciones experimentales

Se utiliza un material de referencia certificado disponible comercialmente dispensado en un tubo de 2 mL de capacidad, que consiste en una suspensión conocida de ooquistes de *Cryptosporidium* purificados mediante citometría de flujo.

Para su uso correcto se siguen las instrucciones indicadas por el fabricante:

- Quitar el tapón del tubo.
- Añadir 2 mL de Tween 20 al 0,05% al tubo.
- Tapar el tubo y agitar en vórtex durante 20 s para homogenizar su contenido.
- Trasvasar el contenido del tubo a la muestra.
- Añadir 3 mL de ADE al tubo vacío.
- Agitar en vórtex durante 20 s.
- Trasvasar de nuevo el contenido del tubo a la muestra.
- Repetir el paso de lavado del tubo una vez más.

6.6.2 Cálculo del porcentaje de recuperación del procedimiento

Este cálculo es imprescindible para realizar estimaciones mínimamente precisas de la concentración real de ooquistes de *Cryptosporidium* en la matriz acuática en estudio, ya que proporciona información sobre la eficacia del procedimiento en su conjunto. Se estima con la fórmula:

$$R\ (\%) = 100.\left(\frac{N}{T}\right)$$

Donde:

R: porcentaje de recuperación.

N: número de ooquistes de *Cryptosporidium* detectados (recuento en la muestra inoculada - recuento de la muestra blanco).

T: número de ooquistes de *Cryptosporidium* inoculados experimentalmente (valor de referencia).

- *Control de exactitud*

La recuperación media obtenida como un control de exactitud tiene que estar comprendida entre 32% como límite inferior y 100%, como límite superior. Estos límites son los establecidos en el Método 1623 de la USEPA.

- *Control de precisión*

Para cada par de valores se calculará la máxima diferencia relativa en porcentaje como:

$$RPD = 100.\frac{(N_A - N_B)}{X_M}$$

Donde:

N_A: Recuento en la muestra inoculada - Recuento de la muestra sin inocular (blanco).

N_B: Recuento en la muestra inoculada duplicada - Recuento de la muestra sin inocular (blanco).

X_M: Media de los recuentos N_A y N_B.

La diferencia entre ambos recuentos N_A y N_B será en valor absoluto.

El valor obtenido se puede representar gráficamente usando como límite de control el valor de 46% establecido en el Método 1623 de la USEPA.

6.7. Métodos alternativos

El principal inconveniente de los métodos estandarizados para la detección y recuento de ooquistes de *Cryptosporidium* en matrices acuáticas es el elevado coste operativo de los elementos usados en los procesos de concentración (filtros, cápsulas) llevados a cabo en los muestreos de campo y de purificación (IMS) y enumeración (inmunofluorescencia directa) realizados en el laboratorio. Por este motivo, diferentes estudios han tratado de adaptar/implementar tecnologías ya existentes para mejorar este procedimiento de forma más coste-efectiva. A continuación, se resumen los principales métodos propuestos para este fin y se discuten sus ventajas y desventajas.

- **Centrifugación de flujo continuo**. La principal ventaja de este procedimiento es que permite prescindir de elementos concentradores como filtros y cápsulas. En su lugar, utiliza una centrífuga con un rotor de flujo continuo que permite centrifugar grandes volúmenes de agua a fuerzas centrífugas elevadas sin el tedio de llenar y decantar gran cantidad de tubos de menor volumen o iniciar/detener el rotor con frecuencia. Sin embargo, el procedimiento sigue requiriendo tanto de IMS (purificación) como de inmunofluorescencia (detección y enumeración). Estudios previos con volúmenes de 10 L de agua experimentalmente inoculados con 10 ooquistes de *Cryptosporidium* han demostrado resultados positivos en el 83,3% (10/12) de las muestras testadas, con recuperaciones de 3,25 ± 3,25 ooquistes (Higgins et al., 2003). Aunque esta tecnología no mejora el rendimiento de la filtración en cápsulas, sí puede ser una alternativa más económica y práctica en muestras de agua con elevada turbidez y bajas concentraciones de ooquistes de *Cryptosporidium*. El sedimento obtenido mediante centrifugación de flujo continuo puede ser analizado mediante PCR convencional o en tiempo real para detección de ADN de *Cryptosporidium* spp. (ver debajo).

- **Ultrafiltración**. Este procedimiento, inicialmente desarrollado para la concentración de virus en matrices acuáticas, reemplaza el uso de filtros/cápsulas por cartuchos de ultrafiltración de fibra hueca capaces de retener partículas de entre 10 000 a 100 000 Da, pero sigue requiriendo IMS e inmunofluorescencia para la purificación y enumeración de ooquistes de *Cryptosporidium*. Así, en un estudio preliminar usando muestras de agua de grifo de 100 L (*n* = 8) inoculadas experimentalmente con 590 000 ± 84 000 ooquistes de *Cryptosporidium* se obtuvieron porcentajes de recuperación del 81–98% en todas ellas (Hill et al., 2007). En un estudio experimental posterior utilizando inóculos de 100 ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras de agua de grifo de 100 L (*n* = 3–5) y agentes químicos

dispersantes como el polifosfato sódico o detergentes como el Tween 80 para mejorar la eficiencia de recuperación del procedimiento, los porcentajes de recuperación obtenidos en condiciones de laboratorio fueron del 67–89% (Polaczyk et al., 2008). Una evolución de esta tecnología, denominada ultrafiltración de punto muerto ha sido protocolizada para su uso en muestras de campo, permitiendo teóricamente el filtrado de volúmenes de 10–50 L de aguas de superficie (dependiendo de su turbidez) y de 100–500 L de agua tratada (Kahler y Hill, 2020). No existe evidencia en la literatura del uso de esta metodología en muestras de agua reales. Aunque la ultrafiltración constituye una alternativa más económica a las cápsulas tipo Envirocheck® HV, no representa una mejora operativa sustancial, ya que sigue requiriendo la filtración de volúmenes elevados de agua y procedimientos complementarios como IMS e inmunofluorescencia directa. El sedimento obtenido mediante esta técnica puede ser analizado mediante PCR convencional o en tiempo real para detección de ADN de *Cryptosporidium* spp. (ver debajo).

- **Filtración en membrana de celulosa**. Este procedimiento representa una opción todavía más asequible y fácil de implementar que los procedimientos estandarizados con filtros/cápsulas, la ultrafiltración o la centrifugación de flujo continuo. Sin embargo, su rendimiento y aplicabilidad se ven afectados por la limitada sensibilidad del método, por lo que su uso debe ser restringido al análisis de aguas no tratadas. Un estudio reciente con esta metodología llevado a cabo en China ha documentado una tasa de recuperación del 38% en inoculaciones experimentales con cantidades conocidas de ooquistes en condiciones de laboratorio (Jingyi et al., 2023).

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Esta tecnología hace posible la amplificación sensible y específica de fragmentos de ácidos nucleicos (ADN y ARN) de *Cryptosporidium* spp. permitiendo (en función del tipo de ensayo utilizado) obtener información sobre i) la especie (e incluso la familia y genotipo) del/los parásito(s) presente(s) en la matriz acuática, ii) la viabilidad del parásito (mediante la detección de mRNA por PCR de transcriptasa inversa) y iii) estimar, mediante el uso de curvas patrón, la concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* presentes en la muestra de agua investigada. Esta información, en su conjunto, es extremadamente útil en estudios epidemiológicos de brotes de transmisión hídrica, ya que permitiría conocer si los ooquistes de *Cryptosporidium* circulantes en agua son viables y pertenecen a especies del parásito capaces de causar infección en humanos. En principio, la presencia de ooquistes de especies de *Cryptosporidium* no infectivas para el hombre o inviables no representan un problema de salud pública, independientemente de la concentración a la que éstos se hallen. La Tabla 12 resume los principales trabajos publicados globalmente utilizando PCR para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en diferentes matrices acuáticas, incluyendo inoculaciones experimentales en condiciones controladas de laboratorio y muestras de agua reales. Como se puede comprobar, el uso de PCR requiere siempre de una muestra previamente concentrada (mediante membrana, filtro o cápsula) e incluso purificada (mediante IMS), por lo que metodológicamente no mejora el flujo de trabajo requerido para completar estos pasos previos. Sí es, sin embargo, un buen sustituto de las técnicas de inmunofluorescencia para la detección y cuantificación de ooquistes, con las ventajas añadidas mencionadas anteriormente.

Tabla 12. *Estudios experimentales y de campo en los que se ha utilizado PCR (en sus diferentes variantes) para la detección y cuantificación de ooquistes de Cryptosporidium en diferentes matrices acuáticas durante el periodo 1996–2023. Se indican los principales parámetros sobre el rendimiento de estos métodos*

Tipo de agua muestreada	Inoculación experimental	Muestras (*n*)	Ooquistes inoculados	Volumen (L)	Filtración	Tipo	Detalle	IMS	IFD	Tipo PCR	Marcador	Muestras positivas (%) o Límite detección PCR	Referencia
Residual	No	33	–	1–15	Sí	Cartucho	P-S2000 400 cm^2	No	Sí	Anidada	*cowp*	51,5	Mayer et al. (1996)
Varias	Sí[1]	4	1 a 10^3	20	No	–	–	Sí	No	RT-PCR	*hsp70*	1 ooquiste	Stinear et al. (1997)
Tratada	Sí[1]	8	10^3 a 10^5	1 000	Sí	Membrana	Acetato de celulosa	No	Sí	qPCR	*cowp*	10^3–10^5 ooquistes / 100 L	Chung et al. (1999)
Ambiental	Sí[1]	6	1 a 10^6	NE	Sí	Membrana	Policarbonato	Sí	Sí	Anidada	*cowp*	10^5 ooquistes	Kostrzynska et al. (1999)
Ambiental	No	56	–	3–205	Sí	Membrana	Policarbonato	Sí	Sí	Anidada	*cowp*	7,1	
Ambiental	Sí[1]	3	10 a 10^4	Hasta 1 000	Sí	Cartucho	Super Micro-Wynd	Sí	Sí	Anidada	*ssu* rRNA	10–10^4 ooquistes / 10 mL	Lowery et al. (2000)
Ambiental	No	55	–	10–60	Sí	Cápsula / membrana	Envirochek® HV / Celulosa	Sí	No	PCR-RFLP	*ssu* rRNA	45,5	Xiao et al. (2001)
Residual	No	49	–	10–60	Sí	Cápsula / membrana	Envirochek® HV / Celulosa	Sí	No	PCR-RFLP	*ssu* rRNA	24,5	
Tratada	Sí[1]	6	10 a 10^4	30–50	Sí	Cápsula	Envirochek® HV	Sí	No	Anidada, RT-PCR	*hsp70*, *ssu* rRNA	8–27 ooquistes	Monis y Saint (2001)
Tratada/no tratada	No	214	–	500–1 000	Sí	Filtro	Cuno Micro-Wynd	Sí	No	Anidada	*ssu* rRNA, TRAP-C2	5,1	Lowery et al. (2001)
Ambiental	No	34	–	40–80	Sí	Cápsula	Envirochek® HV	Sí	No	PCR-RFLP	*ssu* rRNA	14,7	Jellison et al. (2001)
Ambiental	Sí[1]	2	1 a 10^3	2	Sí	Membrana	Policarbonato	Sí	No	Anidada	*cowp*	50–100 ooquistes	Rimhanen-Finne et al. (2002)
Ambiental	No	54	–	6–50	Sí	Cápsula	Envirochek® HV	Sí	No	Anidada	*cowp*	7,4	
Tratada	Sí	4	5–775	20–100	Sí	Cápsula	Envirochek® HV	Sí	No	PCR tiempo real	Secuencia genómica	5–8 ooquistes /100 L	Fontaine y Guillot (2003)
Ambiental	Sí	3	5–775	5	Sí	Cápsula	Envirochek® HV	Sí	No	PCR tiempo real	Secuencia genómica	8 ooquistes / 5 L	
Tratada	Sí	7	5 a 10^4	100	Sí	Cápsula	Envirochek® HV	Sí	No	RT-PCR, PCR	*hsp70*	10 ooquistes	Hallier-Soulier y Guillot (2003)
Reciclada	Sí	4	98–198	10–80		Cápsula	Envirochek® HV	Sí	Sí	PCR-RFLP	*ssu* rRNA	75–76 (recuperación)	Quintero-Betancourt et al. (2003)
	Sí	4	98–198	10–80		Filtro	Polipropileno	Sí	Sí	PCR-RFLP	*ssu* rRNA	11–25 (recuperación)	
Ambiental	Sí[1]	1	50–600	Desconocido	Sí	Filtro	Politetrafluoroetileno	Sí	No	PCR RFLP	*gp40/15*	1 ooquiste	Ochiai et al. (2005)
Ambiental	No	14	–	10	Sí	Filtro	Politetrafluoroetileno	Sí	No	ABC-RT-PCR	*ssu* rRNA	0,1–49 ooquistes / 10 L	Kishida et al. (2012)

Tipo de agua muestreada	Inoculación experimental	Muestras (*n*)	Ooquistes inoculados	Volumen (L)	Filtración	Tipo	Detalle	IMS	IFD	Tipo PCR	Marcador	Muestras positivas (%) o Límite detección PCR	Referencia
	No	14	–	10	Sí	Filtro	Politetrafluoroetileno	Sí	No	PCR tiempo real	*ssu* rRNA	0,4–71 ooquistes / 10 L	
Ambiental	Sí	4	100	10	Sí	Cápsula	Envirochek® HV	Sí	No	qPCR	Secuencia genómica	45 (recuperación)	Loganthan et al. (2012)
	No	72	–	10	Sí	Cápsula	Envirochek® HV	Sí	No	qPCR	Secuencia genómica	16,7	
Ambiental	Sí	1	0,1–100	2	No	–	–	No	No	Anidada	*ssu* rRNA	0,1 ooquistes / mL	Osaki et al. (2013)
Ambiental	Sí	1	1 a 10^3	10	Sí	Cápsula	Envirochek® HV	Sí	No	qPCR	Varios	10 ooquistes	Staggs et al. (2013)
Tratada	Sí	6	10 y 100	10	Sí	Cápsula	IDEXX Filta-Max Xpress	Sí	No	PCR tiempo real	*ssu* rRNA	1 ooquiste	Robinson et al. (2023)

[1]Inoculación experimental en concentrados (0,2–10 mL) de muestras reales negativas a *Cryptosporidium* por IFD.
cowp: proteína de la pared del quiste de *Cryptosporidium* (*Cryptosporidium oocyst wall protein*).
gp40: glicoproteína de 40 kDa (*40-kDa glycoprotein*).
hsp70: proteína de choque térmico de 70 kDa (*70-kDa heat shock protein*).
NE: no especificado.
qPCR: PCR en tiempo real cuantitativa.
RFLP: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*Restriction fragment length polymorphism*).
RT-PCR: PCR con transcriptasa inversa (*Reverse transcription PCR*).
TRAP-C2: proteína adherente relacionada con la trombospondina (*thrombospondin related adhesive protein*).

7. Ejercicio de simulación de evaluación del riesgo hídrico cuantitativo para Cryptosporidium

7.1. Objetivo y alcance del ejercicio

7.2. Datos para la simulación

7.3. Estimación de la dosis de exposición de la población o dosis estimada diaria

7.4. Estimación del riesgo de infección

7. 5. Resultados

7.6. Consideraciones sobre los resultados ofrecidos por la calculadora de riesgo QMRA

7.7. Cálculos de evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico de protozoos. Herramienta Excel (series 1, 2, 3 y 4)

Se realiza un ejercicio de simulación con 4 series de 20 datos ficticios y utilizando valores teóricos de las diferentes variables implicadas, para calcular cuál podría ser, para cada serie, su evaluación de riesgo.

El ejercicio se ha realizado siguiendo lo recogido en la "Guía práctica para la elaboración de un Plan Sanitario del agua en una zona de abastecimiento. Tomo II. Evaluación cuantitativa", elaborada por el Ministerio de Sanidad, con el objetivo de conocer la aplicación práctica de la misma ante la simulación de un caso, y en particular de las fórmulas y herramientas de evaluación de riesgo recogidas en la misma.

7.1. Objetivo y alcance del ejercicio

Se trata de un simulacro para valorar las posibilidades de utilización de los modelos de evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico (QMRA) y las calculadoras diseñadas con este fin, y, en particular, la recogida en la "Guía práctica para la elaboración de un Plan Sanitario del agua en una zona de abastecimiento. Tomo II. Evaluación cuantitativa", elaborada por el Ministerio de Sanidad.

Las variables principales calculadas son la **dosis de exposición de la población o dosis estimada diaria** y el **riesgo de infección/año**.

La utilización de la metodología del QMRA es cada vez más utilizada por los organismos internacionales y gobiernos como base para la toma de decisiones respecto a los riesgos de salud asociados con la presencia de microorganismos patógenos en el agua de consumo.

7.2. Datos para la simulación

Se trabaja con 4 series de 20 datos ficticios de ooquistes/litro en el periodo del 1 al 30 de septiembre de 2023.

Se realizan los cálculos como si fueran datos a la entrada de la planta de tratamiento de aguas de consumo, ETAP.

Los datos vienen expresados en las unidades ooquistes/litro, si bien en la literatura también se utiliza como unidades ooquistes/100 litros (dados los volúmenes de agua necesarios para realizar las determinaciones).

Tabla 13. *Recuentos de ooquistes/L de Cryptosporidium de las 4 series propuestas*

Periodo: 01-09-23/ 30-09-23								
Valores diarios de recuentos de ooquistes (unidad: ooquistes/L)					C: Valores de concentración del microorganismo presente en el agua (ooquistes/L) utilizados en la calculadora QMRA (C)			
Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4			Mínimo	Promedio	Máximo
10	4	0	70		Serie 1	8	10,05	12
9	5	1	30		Serie 2	3	4,9	7
8	4	2	40		Serie 3	0	1	2
10	3	0	100		Serie 4	10	60,5	100
13	5	0	70					
12	5	0	100					
11	7	0	50					
10	4	1	30					
10	6	2	70					
9	5	0	60					
9	6	3	20					
10	4	1	80					
11	5	2	10					
12	4	1	30					
8	5	1	80					
10	4	1	60					
10	5	1	100					
9	4	2	50					
11	7	2	70					
9	6	0	90					

7.3. Estimación de la dosis de exposición de la población o dosis estimada diaria

El siguiente paso en la evaluación de la exposición es valorar cuál es la concentración de microorganismos a la que estaría expuesta la población.

Para calcular **la dosis de exposición de la población o dosis estimada diaria** se utiliza una fórmula común para los tres grupos de microorganismos (bacterias, virus y protozoos) (Microrisk, 2006; Organización Mundial de la Salud, 2016): $Dosis\ diaria = C.10^{-DR}.V.\left(\frac{1}{R}\right).I$

siendo:

- **C**: la concentración del microorganismo (bacterias, virus, protozoos).

- **DR**: la reducción que sufren los microorganismos a lo largo del tratamiento (en log).
- **V**: el volumen de agua que consume la población (unidades de volumen/hab./día).
- **R**: el porcentaje de la recuperación del método de detección.
- **I**: la Infectividad/viabilidad [0–100].

El ejemplo teórico que se sigue para ilustrar el cálculo de las dosis de exposición a los microorganismos son resultados basados en el cálculo puntual (mejor escenario, escenario intermedio y peor escenario).

En la simulación de cada escenario se utilizan los valores de las variables DR, V, R e I de acuerdo con lo que se describe en la guía mencionada anteriormente.

En cuanto a los valores de concentración del microorganismo presente en el agua (C) se utilizan los descritos en las series de datos objeto de la simulación (tabla 13), correlacionando los valores mínimo, promedio y máximo con los escenarios mejor, intermedio y peor, respectivamente.

En concreto, para el volumen de agua que consume la población (V) se consideran los valores de 0,25; 0,842; y 2 L/hab./día, respectivamente, tal y como se describe en la guía mencionada.

La reducción que sufren los microorganismos a lo largo del tratamiento (DR), al considerarse que son datos a la entrada de planta (ETAP), se considera una DR total suma de las DR de las etapas de tratamiento. La DR de cada uno de los escenarios sería: 13, 9,3 y 5,38 unidades logarítmicas, respectivamente.

Como valor para la viabilidad o infectividad de los ooquistes (I), se toma el dato de viabilidad, considerando como valor medio que el 50% son infectivos (Agulló- Barceló y col. 2013), con un rango de 10–90%.

En base a todo lo anterior, los cálculos de **la dosis de exposición de la población o dosis estimada diaria para cada una de las series** planteadas serían los siguientes:

Serie 1

Escenario	Dosis de exposición de la población o dosis estimada diaria
Escenario mejor	$3{,}73.10^{-14}$
Escenario medio	$6{,}59.10^{-09}$
Escenario peor	$6{,}62.10^{-04}$

Serie 2

Escenario	Dosis de exposición de la población o dosis estimada diaria
Escenario mejor	$1{,}40.10^{-14}$
Escenario medio	$3{,}08.10^{-09}$
Escenario peor	$3{,}86.10^{-04}$

Serie 3

Escenario	Dosis de exposición de la población o dosis estimada diaria
Escenario mejor	0,00
Escenario medio	$6{,}28.10^{-10}$
Escenario peor	$1{,}10.10^{-04}$

Serie 4

Escenario	Dosis de exposición de la población o dosis estimada diaria
Escenario mejor	$4{,}66.10^{-14}$

Escenario	Dosis de exposición de la población o dosis estimada diaria
Escenario medio	$3{,}80.10^{-08}$
Escenario peor	$5{,}52.10^{-03}$

El detalle completo de los cálculos realizados para obtener los valores de la dosis de exposición se puede ver en el Anexo 1

7.4. Estimación del riesgo de infección

En gestión de riesgo en QMRA, para establecer el grado de tratamiento necesario en las plantas de tratamiento de agua, se habla del riesgo aceptable o tolerable. El caso más extendido es el de utilizar un modelo con **un valor aceptado de una infección por cada 10 000 habitantes (1.10^{-4})**, de acuerdo con instituciones internacionales como la USEPA (2002)

Otro factor para tener en cuenta es que no todas las infecciones dan una sintomatología "visible". En ocasiones las infecciones pueden ser asintomáticas, sin manifestaciones clínicas en el individuo infectado, mientras que en otros casos sí que desarrollarán la enfermedad.

Así, el **riesgo de enfermedad** se define como:

$$Probabilidad\ (enfermedad) = P\left(\frac{Infección}{Año}\right).S.I$$

siendo:

- P (infección/año): la probabilidad de adquirir la infección a lo largo de un año.
- S: la proporción de la población que puede ser infectada (valor preventivo de 1).
- I: la proporción de individuos que desarrollan la enfermedad una vez infectados (en el caso de *Cryptosporidium* sería de 0,7 (Okhuysen y col., 1998).

Para calcular la P (infección/año), se utiliza el Modelo infección exponencial de Haas y col.

Los modelos establecidos de dosis-respuesta para *Cryptosporidium* se adquirieron a partir de experimentos con individuos sanos a los cuales se les administraba una cantidad conocida de ooquistes y se observaban sus efectos a lo largo del tiempo. A partir de estos estudios se derivaron los modelos de infección por *Cryptosporidium*, en los cuales se observó que seguían un **modelo** de infección de tipo **exponencial,** el cual se ajusta al modelo descrito por la fórmula (Haas, 1983; Haas y col., 1999):

$$P\left(\frac{Inf}{Día}\right) = 1 - e^{-r.D}$$

siendo:

- "D": dosis de exposición al microorganismo en la población (ooquistes/hab./día).
- "r": fracción del patógeno que sobrevive a todas las barreras del huésped y es capaz de iniciar un proceso infectivo en el mismo. Estos valores de "r" se pueden encontrar en la bibliografía científica, a pesar de que no existen valores de dosis-respuesta para todos los microorganismos patógenos. Uno de los valores más utilizados es el descrito por Teunis y col., 1999 (r= 0,0044).

Para evaluar la probabilidad de infección anual, el cálculo se realiza mediante la misma fórmula que la empleada para bacterias y virus:

$$Prob\left(\frac{Infección}{Año}\right) = 1 - \left[1 - Prob\left(\frac{Infección}{Día}\right)\right]^{365}$$

En todo caso, hay que tener en cuenta que estos valores derivan de estudios realizados en individuos sanos y que no representan adecuadamente los efectos que podrían tener ante los subgrupos poblacionales más susceptibles a la infección (inmunodeprimidos, niños, ancianos, etc.).

En base a todo lo anterior, los cálculos **de la probabilidad de infección anual para cada una de las series** planteadas en el ejercicio serían los siguientes:

Serie 1

Escenario	Probabilidad de infección anual o P (infecc./año)
Escenario mejor	0,00
Escenario medio	$1{,}06.10^{-08}$
Escenario peor	$1{,}06.10^{-03}$

Serie 2

Escenario	Probabilidad de infección anual o P (infecc./año)
Escenario mejor	0,00
Escenario medio	$4{,}94.10^{-09}$
Escenario peor	$6{,}20.10^{-04}$

Serie 3

Escenario	Probabilidad de infección anual o P (infecc./año)
Escenario mejor	0,00
Escenario medio	$1{,}01.10^{-09}$
Escenario peor	$1{,}77.10^{-04}$

Serie 4

Escenario	Probabilidad de infección anual o P (infecc./año)
Escenario mejor	0,00
Escenario medio	$6{,}10.10^{-08}$
Escenario peor	$8{,}82.10^{-03}$

El detalle completo de los cálculos realizados para obtener los valores de la dosis de exposición se puede ver más adelante.

7.5. Resultados

Se observa que, tomando los valores de estimación de riesgo para el peor escenario, los resultados son los siguientes:

En cuanto a las **dosis de exposición de la población o dosis estimada diaria**, de mayor a menor, serían:

- dosis de exposición de la serie 4 = $5{,}52.10^{-3}$ o 0,00552;
- dosis de exposición de la serie 1 = $6{,}62.10^{-04}$ o 0,000662;

- dosis de exposición de la serie 2 = $3{,}86.10^{-04}$ o 0,000386;
- dosis de exposición de la serie 3 = $1{,}10.10^{-04}$ o 0,0001.

Y los valores de la probabilidad o riesgo de infección/año de cada una de las series serían:

- riesgo de infección/año en la serie 4 = $8{,}82.10^{-03}$ (p= 0,00882);
- riesgo de infección/año en la serie 1 = $1{,}06.10^{-03}$ (p= 0,00106);
- riesgo de infección/año en la serie 2 = $6{,}20.10^{-04}$ (p= 0,000620);
- riesgo de infección/año en la serie 3 = $1{,}77.10^{-04}$ en la serie 3 (p= 0,000177).

Los organismos internacionales, como USEPA, sitúan el valor aceptado en un riesgo de infección anual de 1 infección por cada 10.000 habitantes (1.10^{-4} o 1,00E-04 o 0,0001).

De acuerdo con lo anterior, las series de datos 4, 1 y 2 utilizadas para realizar este ejercicio de simulación se encontrarían de forma clara fuera de los límites aceptados, y sólo la serie 3 se situaría cercana a los mismos, en función del grado de precisión que se considere a la hora de expresar los resultados.

7.6. Consideraciones sobre los resultados ofrecidos por la calculadora de riesgo QMRA

El modelo teórico que se sigue para el cálculo de las dosis de exposición a los microorganismos ofrece resultados basados en el cálculo puntual (mejor escenario, escenario intermedio y peor escenario) de forma que tanto la dosis de exposición como el riesgo de infección adoptan diferentes valores en cada escenario en función de variables dependientes de cada planta de tratamiento de aguas (p.ej. la dosis de reducción o DR), del dato de consumo de agua de la población que se utilice o del método de recuperación para la cuantificación de los microorganismos, entre otros. En una situación en la que se presupone que se parte de la existencia de brotes entre la población a la que suministran las plantas origen de los datos, a los efectos de valorar el restablecimiento de suministro se considera que, aplicando el principio de precaución, lo más conveniente sería utilizar los cálculos de las dosis de exposición de la población y del riesgo de infección correspondientes al supuesto del peor escenario.

En cuanto al riesgo o probabilidad de infección, se destaca el valor de la probabilidad de infección anual, a pesar de que también se ofrecen los cálculos realizados para la probabilidad de infección/día. El motivo es que el objetivo que establece la Regla de Tratamiento de Aguas superficiales (SWTR, por sus siglas en inglés) de la USEPA, para dar cumplimiento a *The Long Term 1 Enhanced Surface Water Treatment Rule* (L T1 ESWTR), es reducir el riesgo que supone para la salud pública la infección por *Giardia lamblia*, *Legionella* o virus a menos de 1 infección por año por cada 10.000 personas. Este límite de riesgo de infección anual de 1 infección cada 10.000 personas es el que se considera de forma general en los modelos QMRA de evaluación de riesgo, tanto de infección por bacterias, como de virus y protozoos. Sin embargo, el SWTR no tiene en cuenta los sistemas con altas concentraciones de patógenos en el agua de origen, que, cuando se tratan en los niveles requeridos según la regla, aún pueden no cumplir con este objetivo de salud. La anterior regla SWTR tampoco controla específicamente el protozoo *Cryptosporidium*.

Por último, se insiste en que a pesar de la posible utilidad de las calculadoras de riesgo QMRA es necesario recordar que se trata de cálculos basados en modelos teóricos que es necesario interpretar en el contexto de la situación epidemiológica concreta y sobre la base de los datos de las plantas de tratamiento de agua que abastezcan a la población de estudio.

7.7. Cálculos de evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico de protozoos. Herramienta Excel (series 1, 2, 3 y 4)

Los datos aquí reflejados para realizar los cálculos se corresponden con una simulación a modo de ejemplo para visualizar el uso de la herramienta. A la hora de utilizar la herramienta en una evaluación real, para los valores de la concentración del microorganismo se deberían utilizar series de datos reales con los resultados de los análisis que se lleven a cabo durante el periodo de estudio (con un mínimo 20- 30 datos) identificando los valores mínimo, promedio y máximo para los escenarios mejor, intermedio y peor, respectivamente. Asimismo, los valores del valor de reducción deberían ser los que se correspondan con la planta de tratamiento origen del suministro que se quiera estudiar de acuerdo con el tipo de tratamiento que realicen. En cuanto a los valores del factor de recuperación del método utilizado en el laboratorio para detectar el microorganismo -necesario para corregir las concentraciones observadas, si no se dispone de datos propios, se pueden utilizar los indicados en la Guía para los diferentes grupos de microorganismos.

Serie 1

CÁLCULO PROBABILIDAD INFECCIÓN

Dosis estimada diaria= C x10$^{(-DR)}$ x V x (1/R) x I

(o Dosis de exposición) (Microrisk, 2006; OMS, 2016)

Microorganismo modelo o referencia	PROTOZOO	ENTRADA PLANTA		
		Cryptosporidium		
	periodo	01/09/2023		
		30/09/2023		
	n	20		
C: Concentración del microorganismo presente en el agua (oocistes/L)	C	MIN	PROMEDIO	MÁX
		8,00E+00	1,05E+01	1,20E+01
DR: Valor de reducción/eliminación del microorganismo a lo largo del tratamiento (LOG)	DR	13	9,3	5,38
V: Volumen de agua que consume un persona por día (L/hab./ día)	V	0,25	0,842	2
R: "Porcentaje" (tanto por 1) de recuperación del método de detección [0- 1]	R	0,536	0,336	0,136
I: Viabilidad/Infectividad [0- 1]	I	0,1	0,5	0,9
	DOSIS ESTIMADA DIARIA	0,00000	0,00000	0,00066
		3,73E-14	**6,59E-09**	**6,62E-04**
Riesgo de Infección				
r (Teunis y col., 1999)	r	0,0044	0,0044	0,0044
$Prob_{(inf/día)} = 1-e^{-r \times D}$	P(inf/día)	0,00E+00	2,90E-11	2,91E-06
$Prob_{(inf/anual)} = 1-[1-Prob_{(infección/día)}]^{365}$	P(inf/año)	0,00E+00	1,06E-08	1,06E-03

Modelo infección exponencial fórmula de Haas, 1983; Haas y col., 1999
"D": dosis de exposición al microorganismo en la población (oocistes/hab./día).
"r": fracción del patógeno que sobrevive a todas las barreras del huésped y es capaz de iniciar un proceso infectivo en el huésped. Estos valores de "r" se pueden encontrar en la bibliografía científica a pesar de que no existen valores de dosis-respuesta para todos los microorganismos patógenos. Uno de los valores más utilizados es el descrito por Teunis y col., 1999

Serie 2

CÁLCULO PROBABILIDAD INFECCIÓN

Dosis estimada diaria= C x10$^{(-DR)}$ x V x (1/R) x I

(o Dosis de exposición) (Microrisk, 2006; OMS, 2016)

Microorganismo modelo o referencia	PROTOZOO	ENTRADA PLANTA		
		Cryptosporidium		
	periodo	01/09/2023		
		30/09/2023		
	n	20		
C: Concentración del microorganismo presente en el agua (oocistes/L)	C	MIN	PROMEDIO	MÁX
		3,00E+00	4,90E+00	7,00E+00
DR: Valor de reducción/eliminación del microorganismo a lo largo del tratamiento (LOG)	DR	13	9,3	5,38
V: Volumen de agua que consume un persona por día (L/hab./ día)	V	0,25	0,842	2
R: "Porcentaje" (tanto por 1) de recuperación del método de detección [0- 1]	R	0,536	0,336	0,136
I: Viabilidad/Infectividad [0- 1]	I	0,1	0,5	0,9
	DOSIS ESTIMADA DIARIA	0,00000	0,00000	0,00039
		1,40E-14	**3,08E-09**	**3,86E-04**

Riesgo de Infección

r (Teunis y col., 1999)	r	0,0044	0,0044	0,0044
$Prob_{(inf/día)} = 1-e^{-r \times D}$	P(inf/día)	0,00E+00	1,35E-11	1,70E-06
$Prob_{(inf/anual)} = 1-[1-Prob_{(infección/día)}]^{365}$	P(inf/año)	0,00E+00	4,94E-09	6,20E-04

Modelo infección exponencial fórmula de Haas, 1983; Haas y col., 1999
"D": dosis de exposición al microorganismo en la población (oocistes/hab./día).
"r": fracción del patógeno que sobrevive a todas las barreras del huésped y es capaz de iniciar un proceso infectivo en el huésped. Estos valores de "r" se pueden encontrar en la bibliografía científica a pesar de que no existen valores de dosis-respuesta para todos los microorganismos patógenos. Uno de los valores más utilizados es el descrito por Teunis y col., 1999

Serie 3

CÁLCULO PROBABILIDAD INFECCIÓN

Dosis estimada diaria= C x10$^{(-DR)}$ x V x (1/R) x I

(o Dosis de exposición) (Microrisk, 2006; OMS, 2016)

Microorganismo modelo o referencia	PROTOZOO	ENTRADA PLANTA		
		Cryptosporidium		
	periodo	01/09/2023		
		30/09/2023		
	n	20		
C: Concentración del microorganismo presente en el agua (oocistes/L)	C	MIN	PROMEDIO	MÁX
		0,00E+00	1,00E+00	2,00E+00
DR: Valor de reducción/eliminación del microorganismo a lo largo del tratamiento (LOG)	DR	13	9,3	5,38
V: Volumen de agua que consume un persona por día (L/hab./ día)	V	0,25	0,842	2
R: "Porcentaje" (tanto por 1) de recuperación del método de detección [0- 1]	R	0,536	0,336	0,136
I: Viabilidad/Infectividad [0- 1]	I	0,1	0,5	0,9
	DOSIS ESTIMADA DIARIA	0,00000	0,00000	0,00011
		0,00E+00	**6,28E-10**	**1,10E-04**

Riesgo de Infección

r (Teunis y col., 1999)	r	0,0044	0,0044	0,0044
$Prob_{(inf/día)} = 1-e^{-r \times D}$	P(inf/día)	0,00E+00	2,76E-12	4,86E-07
$Prob_{(inf/anual)} = 1-[1-Prob_{(infección/día)}]^{365}$	P(inf/año)	0,00E+00	1,01E-09	1,77E-04

Modelo infección exponencial fórmula de Haas, 1983; Haas y col., 1999
"D": dosis de exposición al microorganismo en la población (oocistes/hab./día).
"r": fracción del patógeno que sobrevive a todas las barreras del huésped y es capaz de iniciar un proceso infectivo en el huésped. Estos valores de "r" se pueden encontrar en la bibliografía científica a pesar de que no existen valores de dosis-respuesta para todos los microorganismos patógenos. Uno de los valores más utilizados es el descrito por Teunis y col., 1999

Serie 4

CÁLCULO PROBABILIDAD INFECCIÓN

Dosis estimada diaria= C x10$^{(-DR)}$ x V x (1/R) x I

(o Dosis de exposición) (Microrisk, 2006; OMS, 2016)

Microorganismo modelo o referencia	PROTOZOO	ENTRADA PLANTA		
		Cryptosporidium		
	periodo	01/09/2023		
		30/09/2023		
	n	20		
C: Concentración del microorganismo presente en el agua (oocistes/L)	C	MIN	PROMEDIO	MÁX
		1,00E+01	6,05E+01	1,00E+02
DR: Valor de reducción/eliminación del microorganismo a lo largo del tratamiento (LOG)	DR	13	9,3	5,38
V: Volumen de agua que consume un persona por día (L/hab./ día)	V	0,25	0,842	2
R: "Porcentaje" (tanto por 1) de recuperación del método de detección [0- 1]	R	0,536	0,336	0,136
I: Viabilidad/Infectividad [0- 1]	I	0,1	0,5	0,9
	DOSIS ESTIMADA DIARIA	0,00000	0,00000	0,00552
		4,66E-14	**3,80E-08**	**5,52E-03**

Riesgo de Infección

r (Teunis y col., 1999)	r	0,0044	0,0044	0,0044
$Prob_{(inf/día)} = 1-e^{-r \times D}$	P(inf/día)	0,00E+00	1,67E-10	2,43E-05
$Prob_{(inf/anual)} = 1-[1-Prob_{(infección/día)})]^{365}$	P(inf/año)	0,00E+00	6,10E-08	8,82E-03

Modelo infección exponencial fórmula de Haas, 1983; Haas y col., 1999
"D": dosis de exposición al microorganismo en la población (oocistes/hab./día).
"r": fracción del patógeno que sobrevive a todas las barreras del huésped y es capaz de iniciar un proceso infectivo en el huésped. Estos valores de "r" se pueden encontrar en la bibliografía científica a pesar de que no existen valores de dosis-respuesta para todos los microorganismos patógenos. Uno de los valores más utilizados es el descrito por Teunis y col., 1999

8. Bibliografía

-Abramovich, B., Lura, M.C., Carrera, E., Gilli, M.I., Haye, M.A., & Vaira, S. (2004). The action of different coagulants to remove Cryptosporidium during the process of water treatment. *Revista Argentina de microbiología*, 36(2), 92-6.

-Agulló-Barceló, M., Oliva F., & Lucena F. (2013). Alternative indicators for monitoring Cryptosporidium oocysts in reclaimed water. *Environmental Science and Pollution Research*, *20*(7), 4261-4271. https: //doi.org/10.1007/s11356-012-1400-4

-Atherholt, T.B., LeChevallier, M.W., Norton, W.D., &, Rosen, J.S. (1998). Effect of Rainfall on Giardia and Crypto. *Journal of the American Water Works Association*, *90*(9), 66-80. https: //doi.org/10.1002/j.1551-8833.1998.tb08499.x

-AWWA Research Foundation & American Water Works Association. (n.d.). *Technical report*. Denver, CO: AWWA. (56 pp.)

-Benedict, K.M., Reses, H., Vigar, M., Roth, D.M., Roberts, V.A., Mattioli, M., Cooley, L.A., Hilborn, E. D., Wade, T. J., Fullerton, K. E., Yoder, J. S., & Hill, V. R. (2017). Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water - United States, 2013-2014. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *66*(44), 1216–1221. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6644a3

-Betancourt, W. Q., & Rose, J. B. (2004). Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary Parasitology*, *126*(1–2), 219–234. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.002

-Bouchier, I. (1998). *Cryptosporidium in water supplies: Third report of the Group of Experts*. London, UK: HMSO. https://www.dwi.gov.uk/water-companies/guidance-and-codes-of-practice/

-Bourli, P., Eslahi, A. V., Tzoraki, O., & Karanis, P. (2023). Waterborne transmission of protozoan parasites: A review of worldwide outbreaks—An update 2017–2022. *Journal of Water and Health*, *21*(10), 1421–1447. https://doi.org/10.2166/wh.2023.094

-Braghetta, A., Jacangelo, J. G., Chellam, S., Hotaling, M. L., & Utne, B. A. (1997). DAF pretreatment: Its effect on MF performance. *Journal of the American Water Works Association*, *89*, 90–101

-Butkus, M. A., Bays, J. T., & Labare, M. P. (2003). Influence of surface characteristics on the stability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(7), 3819–3835. https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3819-3835.2003

-Cacciò, S. M., & Chalmers, R. M. (2016). Human cryptosporidiosis in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, *22*(6), 471–480. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.021

-Carmena, D. (2010). Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: Detection, surveillance and implications for public health. En A. Méndez-Vilas (Ed.), *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology* (Vol. 1, pp. 3–14). Badajoz, Spain: Formatex Research Center.

-Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2001). Prevalence of parasites in fecal material from chlorinated swimming pools — United States, 1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 50*(20), 410–412. https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5020a4.htm

-Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III**.** (2023). *Informe epidemiológico sobre la situación de la criptosporidiosis en España. Año 2022*. https://internacional.isciii.es/documents/d/cne/informe_criptosporidium_2022-pdf.

-Chalmers, R. M., Robinson, G., Elwin, K., & Elson, R. (2019). Analysis of the *Cryptosporidium* spp. and gp60 subtypes linked to human outbreaks of cryptosporidiosis in England and Wales, 2009 to 2017. *Parasites & Vectors*, *12*(1), 95. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3354-6

-Chappell, C. L., Okhuysen, P. C., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D. E., Tanriverdi, S., & Tzipori, S. (2006). *Cryptosporidium hominis*: Experimental challenge of healthy adults. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *75*(5), 851–857. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.851

-Chauret, C., Nolan, K., Chen, P., Springthorpe, S., & Sattar, S. (1998). Aging of *Cryptosporidium parvum* oocysts in river water and their susceptibility to disinfection by chlorine and monochloramine. *Canadian Journal of Microbiology*, *44*(12), 1154–1160.

-Cox, P., Hawkins, P., Warnecke, M., Ferguson, C., Deere, D., Bustamante, H., Swanson, P., Griffith, M., Tamsitt, L., & Nicholson, C. (2004). The risk of *Cryptosporidium* to Sydney's drinking water supply. En R. C. A. Thompson, A. Armson, & U. M. Ryan (Eds.), *Cryptosporidium: From molecules to disease* (pp. 325–340). Elsevier.

-Craik, S. A., Weldon, D., Finch, G. R., Bolton, J. R., & Belosevic, M. (2001). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium- and low-pressure ultraviolet radiation. *Water Research*, *35*(6), 1387–1398. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00386-1

-Dacal, E., Köster, P. C., & Carmena, D. (2020). Diagnóstico molecular de parasitosis intestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Ed. en inglés)*, *38*(Suppl 1), 24–31. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.02.005

-de Lucio, A., Bailo, B., Aguilera, M., Cardona, G. A., Fernández-Crespo, J. C., & Carmena, D. (2017). No molecular epidemiological evidence supporting household transmission of zoonotic *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from pet dogs and cats in the province of Álava, Northern Spain. *Acta Tropica*, *170*, 48–56. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.024

-Degremont. (1979). *Manual Técnico del Agua*.

-Federation of Tour Operators (FTO) & Confederación Española de Hoteles y Apartamentos Turísticos (CEHAT). (2004). *Cryptosporidiasis: Plan de actuación para el sector turístico*.

-Franceschelli, A., Bonadonna, L., Cacciò, S. M., Sannella, A. R., Cintori, C., Gargiulo, R., Coccia, A. M., Paradiso, R., Iaconelli, M., Briancesco, R., & Tripodi, A. (2022). An outbreak of cryptosporidiosis associated with drinking water in north-eastern Italy, August 2019: microbiological and environmental investigations. *Eurosurveillance, 27*(35), pii=2200038. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.35.2200038

-French, K., Guest, R. K., Finch, G. R., & Haas, C. N. (2000). Correlating *Cryptosporidium* removal using dissolved air flotation in water treatment. *Water Research*, *34*, 4116–4119

-GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators. (2017). Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Infectious Diseases, 17*(9), 909–948. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30276-1.

-Generalitat Valenciana. (2018). *Decreto 85/2018, de 22 de junio, del Consell, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios aplicables a las piscinas de uso público* (DOGV núm. 8331, de 4 de julio de 2018). https://dogv.gva.es/datos/2018/07/04/pdf/2018_6541.pdf[1](https://dogv.gva.es/datos/2018/07/04/pdf/2018_6541.pdf)

-Generalitat Valenciana. DG de Salut Pública. (2005). Medidas a adoptar para el control de Cryptosporidium en piscinas (IT-Crypto-CV-050224-(1)).

-Gobierno de España. (2013). Real Decreto 742/2013, de 27 de septiembre, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de las piscinas. Boletín Oficial del Estado, núm. 244, 13 de octubre de 2013. Obtenido de https://www.boe.es/eli/es/rd/2013/09/27/742/con

-Gobierno de España. (2015). Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental. Boletín Oficial del Estado, núm. 219, 12 de septiembre de 2015. Obtenido de https://www.boe.es/eli/es/rd/2015/09/11/817/con

-Gobierno de España. (2023). Real Decreto 3/2023, de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro. Boletín Oficial del Estado, núm. 9, 11 de enero de 2023. Obtenido de https://www.boe.es/eli/es/rd/2023/01/10/3/con

-Gómez, M. S., Gracenea, M., Ángel, L., & Beneyto, V. (2011). *Cryptosporidium sp. in public swimming pools in Barcelona*. En D. Muñoz-Torrero (Ed.), *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* (pp. 275–282). Kerala, India: Transworld Research Network. ISBN: 978-81-7895-528-5. https://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/21365/1/12MT.pdf

-Gracenea, M., Castaño, S., Méndez, J., Lucena, F., & Gómez, M. S**.** (2018). Faecal contamination in public pools in Barcelona province: *Cryptosporidium spp.* and bacterial indicators. *Journal of Water and Health, 16*(5), 762–772. https://doi.org/10.2166/wh.2018.267

-Haas, C. N. (1999). *Quantitative microbial risk assessment*. New York, NY: John Wiley & Sons.

-Haas, C. N. (1983). Estimation of risk due to low doses of microorganisms: A comparison of alternative methodologies. *American Journal of Epidemiology, 118*(4), 573–582. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113662

-Haas, C. N., & Kaymak, B. (2003). Effect of initial microbial density on inactivation of *Giardia muris* by ozone. *Water Research, 37*(12), 2980–2988. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00132-4

-Higgins, J. A., Trout, J. M., Fayer, R., Shelton, D., & Jenkins, M. C. (2003). Recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples using continuous flow centrifugation. *Water Research, 37*(15), 3551–3560. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00251-3

-Hill, V. R., Kahler, A. M., Jothikumar, N., Johnson, T. B., Hahn, D., & Cromeans, T. L. (2007). Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Applied and Environmental Microbiology, 73*(13), 4218–4225. https://doi.org/10.1128/AEM.02713-06.

-Huck, P. M., Coffey, B. M., Emelko, M. B., Maurizio, D. D., Slawson, R. M., Anderson, W. B., & Melia, C. R. (2002). Effects of filter operation on *Cryptosporidium* removal. *Journal AWWA, 94*(6), 97–111

-Jacangelo, J. G., Rhodes Trussell, R., & Watson, M. (1997). Role of membrane technology in drinking water treatment in the United States. *Desalination*, 113, 119–127. https://doi.org/10.1016/S0011-9164(97)00120-300120-3)

-Jakubowski, W., & Craun, G. F. (2002). Update on the control of Giardia in water supplies. En Olson, B. E., & Olson, R. (Eds.), *Giardia and Cryptosporidium: From Molecules to Disease* (pp. 123-145). Springer.

-Jingyi, J., Ping, Y., Jian, X., Jia, C., Xujian, M., Qiong, L., Bowen, T., & Fengming, W. (2023). Efficacy of a membrane concentration method combined with real-time PCR for detection of Giardia and Cryptosporidium in drinking water. *Letters in Applied Microbiology*, 76(10), ovad121. https://doi.org/10.1093/lambio/ovad121

-Kahler, A. M., & Hill, V. R. (2020). Detection of Cryptosporidium recovered from large-volume water samples using dead-end ultrafiltration. *Methods in Molecular Biology*, 2052, 23-41. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9748-0_3

-Kistemann, T., Classen, T., Koch, C., Dangendorf, F., Fischeder, R., Gebel, J., Vacata, V., & Exner, M. (2002). Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Applied and Environmental Microbiology, 68*(5), 2188-2197. https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2188-2197.2002

-Korich, D. G., Mead, J. R., Madore, M. S., Sinclair, N. A., & Sterling, C. R. (1990). Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on Cryptosporidium parvum oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology, 56*(5), 1423-1428. https://doi.org/10.1128/AEM.56.5.1423-1428.1990

-Köster, P. C., Dacal, E., Dashti, A., & Carmena, D. (2024a). Cryptosporidium. En Sails, A. D., Liu, D., Hindiyeh, M., Tang, Y.-W., Zhang, J.-R., Maloy, S., & Spearman, P. (Eds.), *Molecular Medical Microbiology* (pp. 3091–3106). Elsevier. ISBN: 978-0-12-818619-0.

-Köster, P. C., Dashti, A., Hernández-Castro, C., Bailo, B., Rodríguez-Escolar, I., González-Barrio, D., & Carmena, D. (2024b). Criptosporidiosis. En Morchón, R. (Ed.), *Biología y diagnóstico de enfermedades parasitarias humanas relevantes en España* (pp. 19–30). Ediciones Universidad Salamanca. ISBN: 978-84-1311-903-8.

-Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Farag, T. H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S. O., Sur, D., Breiman, R. F., Faruque, A. S., Zaidi, A. K., Saha, D., Alonso, P. L., Tamboura, B., Sanogo,

D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ochieng, J. B., Omore, R., Oundo, J. O., Hossain, A., Das, S. K., Ahmed, S., Qureshi, S., Quadri, F., Adegbola, R. A., Antonio, M., Hossain, M. J., Akinsola, A., Mandomando, I., Nhampossa, T., Acácio, S., Biswas, K., O'Reilly, C. E., Mintz, E. D., Berkeley, L. Y., Muhsen, K., Sommerfelt, H., Robins-Browne, R. M., & Levine, M. M. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet, 382*(9888), 209–222. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-260844-2)

-LeChevallier, M. W., Norton, M. W., & Lee, R. G. (1991). Giardia and *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies. *Applied and Environmental Microbiology, 57*(9), 2610-2616. https://doi.org/ DOI: 10.1128/aem.57.9.2617-2621.1991

-Linden, K. G., Shin, G., Fauber, G., Cairns, W., & Sobsey, M. D. (2002). UV disinfection of Giardia lamblia cysts in water. *Environmental Science & Technology, 36*(11), 2519-2522. https://doi.org/10.1021/es0113403

-Liyanage, L. R. J., Finch, G. R., & Belosevic, M. (1997). Sequential disinfection of *Cryptosporidium parvum* by ozone and chlorine dioxide. *Ozone: Science & Engineering, 19*(5), 409-423.

-Mahon, M., & Doyle, S. (2017). Waterborne outbreak of cryptosporidiosis in the South East of Ireland: weighing up the evidence. *Irish Journal of Medical Science*, 186(4), 989-994. https://doi.org/10.1007/s11845-016-1552-1

-Medema, G. (2006). Microrisk. Quantitative Microbial Risk Assessment in the Water Safety Plan. Final report.

-Medema, G. J., Hoogenboezem, W., van der Veer, A. J., Ketelaars, H. A. M., Hijnen, W. A. M., & Nobel, P. J. (2003). Quantitative risk assessment of *Cryptosporidium* in surface water treatment. *Water Science and Technology, 47*(3), 241-247. https://doi.org/10.2166/wst.2003.0202

-Ministerio de Sanidad. (2024). Guía práctica para la elaboración de un Plan Sanitario del agua en una zona de abastecimiento. Evaluación cuantitativa. https://www.sanidad.gob.es/areas/sanidadAmbiental/calidadAguas/aguasConsumoHumano/publicaciones/docs/2024_PSA_CUANTITATIVO.pdf

-Ministerio de Sanidad. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. (2023). Evaluación Rápida del Riesgo. Informe Incremento de casos y brotes de criptosporidiosis en España 2023. Obtenido de https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/alertasActuales/criptosporidiosis/docs/2023.11.16_EvaluacionRapidadelRiesgo_Cryptosporidium.pdf

-Mosse, P. (2009). Longterm filter monitoring and safe drinking water – data from two Australian water utilities. *Water Works – Official Journal of the Water Industry Operators Association*, June 2009, Water Industry Operators Association, Shepparton, pp. 8-11.

-Mosse, P., & Murray, B. (2008). Practical Guide to the Operation and Optimisation of Media Filters. Water Industry Operators Association, Shepparton.

-National Health and Medical Research Council (NHMRC), & Natural Resource Management Ministerial Council (NRMMC). (2011). *Australian Drinking Water Guidelines 6, 2011 – Version 3.8, updated*

September 2022. Australian Government, Department of Health and Aged Care. https://www.health.gov.au/resources/publications/australian-drinking-water-guidelines

-Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., Crabb, J. H., Sterling, C. R., & DuPont, H. L. (1999). Virulence of three distinct Cryptosporidium parvum isolates for healthy adults. *Journal of Infectious Diseases, 180*(4), 1275–1281. https://doi.org/10.1086/315033

-Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., Crabb, J., Valdez, L. M., Douglass, E. T., & DuPont, H. L. (1998). Prophylactic effect of bovine anti-Cryptosporidium hyperimmune colostrum immunoglobulin in healthy volunteers challenged with *Cryptosporidium parvum*. *Clinical Infectious Diseases, 26*(6), 1324-1329. https://doi.org/10.1086/516374[1]

-Ongerth, J. E., & Hutton, P. E. (1997). DE (diatomaceous earth) filtration to remove *Cryptosporidium*. *Journal of the American Water Works Association, 89*(1), 39-46. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1997.tb08901.x

-Ongerth, J. E., & Hutton, P. E. (2001). Testing of diatomaceous earth filtration for removal of *Cryptosporidium* oocysts. *Journal of the American Water Works Association, 93*(12), 54-63. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2001.tb09355.x

-Organización Mundial de la Salud. (2006). Guidelines for safe recreational water environments. Volume 2. Swimming pools and similar environments. https://www.who.int/publications/i/item/9241546808

-Parker, J. F. W., Greaves, G. F., & Smith, H. V. (1993). The effect of ozone on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts and a comparison of experimental methods. *Water Science and Technology, 27*, 93-96.

-Peñuelas Martinez, M., Carmena, D., Guzmán Herrador, B. R., Palau Miguel, M., Saravia Campelli, G., García Álvarez, R. M., Guerrero-Vadillo, M., Dashti, A., Köster, P. C., Guevara Alemany, E., Simón Soria, F., Fuentes Corripio, I., Varela Martínez, C., & Sierra Moros, M. J.; working group for the National Surveillance Network; Collaborators. (2024). Marked increase in cryptosporidiosis cases, Spain, 2023. *Euro Surveillance, 29*(28), 2300733. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.28.2300733

-Plummer, J. D., Edzwald, J. K., & Kelley, M. B. (1995). Removing *Cryptosporidium* by dissolved air-flotation. *Journal of the American Water Works Association, 87*(1), 85-95.

-Polaczyk, A. L., Narayanan, J., Cromeans, T. L., Hahn, D., Roberts, J. M., Amburgey, J. E., & Hill, V. R. (2008). Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple microbe classes from 100-L tap water samples. *Journal of Microbiological Methods, 73*(2), 92-99. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.02.014

-Pool Water Treatment Advisory Group. (2021). *Code of practice: The management and treatment of swimming pool water* (Updated May 2023). https://www.pwtag.org/code-of-practice/

-Pool Water Treatment Advisory Group. (2023). *Faecal contamination* (Version 3 – April 2023). Updated in line with the Code of Practice. https://www.pwtag.org/technical-notes/.

-Puleston, R. L., Mallaghan, C. M., Modha, D. E., Hunter, P. R., Nguyen-Van-Tam, J. S., Regan, C. M., Nichols, G. L., & Chalmers, R. M. (2014). The first recorded outbreak of cryptosporidiosis due

to *Cryptosporidium cuniculus* (formerly rabbit genotype), following a water quality incident. *Journal of Water and Health, 12*(1), 41-50. https://doi.org/10.2166/wh.2013.097

-Quintero-Betancourt, W., Gennaccaro, A. L., Scott, T. M., & Rose, J. B. (2003). Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. *Applied and Environmental Microbiology, 69*(9), 5380-5388. https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5380-5388.2003

-Ramírez Quirós, F. (2017). *Tratamiento de desinfección del agua potable*. Canal de Isabel II. https://www.fundacioncanal.com/canaleduca/wp-content/uploads/2015/08/Tratamiento-de-desinfeccion-del-agua-potable2.pdf.

-Rose, J. B., & H. D. (2002). Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiology Reviews, 26*(2), 113-123. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00604.x

-Rossignol, J. F. (2010). Cryptosporidium and Giardia: treatment options and prospects for new drugs. *Experimental Parasitology, 124*(1), 45–53. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.07.005

-Ryan, U. M., Feng, Y., Fayer, R., & Xiao, L. (2021). Taxonomy and molecular epidemiology of Cryptosporidium and Giardia - a 50 year perspective (1971-2021). *International Journal of Parasitology, 51*(13–14), 1099–1119. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.007

-Salinas, R., Andrés, L., Almenar, P., Macián, V. J., Ribera, R., & Domínguez, C. (2017). Optimización de la filtración en una estación de tratamiento de agua potable convencional. *Tecnoaqua, 28*, 54-62

-Schönning, C., Lilja, M., Lebbad, M., Ljung, T., Allestam, G., Ferm, M., Björkholm, B., Hansen, A., Hiltula, J., Långmark, J., Löfdahl, M., Omberg, M., Reuterwall, C., Samuelsson, E., Widgren, K., Wallensten, A., & Lindh, J. (2014). Large outbreak of Cryptosporidium hominis infection transmitted through the public water supply, Sweden. *Emerging Infectious Diseases, 20*(4), 581–589. https://doi.org/10.3201/eid2004.121415

-Schuler, P. F., & Ghosh, M. M. (1990). Diatomaceous earth filtration of cysts and other particulates using chemical. *Journal of the American Water Works Association*. https://doi.org/10.2307/41293097

-Shaw, K., Walker, S., & Koopman, B. (2000). Improving filtration of Cryptosporidium. *Journal of the American Water Works Association, 92*, 103–111. https://doi.org/10.2166/wh.2025.006

-Shields, J. M., Hill, V. R., Arrowood, M. J., & Beach, M. J. (2008). Inactivation of Cryptosporidium parvum under chlorinated recreational water conditions. *Journal of Water and Health, 6*(4), 513–520. https://doi.org/10.2166/wh.2008.068

-Sponseller, J. K., Griffiths, J. K., & Tzipori, S. (2014). The evolution of respiratory cryptosporidiosis: Evidence for transmission by inhalation. *Clinical Microbiology Reviews, 27*(3), 575–586. https://doi.org/10.1128/CMR.00115-13

-States, S. M., Tomko, R., Scheuring, M., & Casson, L. (2002). Enhanced coagulation and removal of Cryptosporidium. *Journal of the American Water Works Association, 94*, 67–77. https://doi.org/10.2166/wh.2025.006

-Teunis, P. F. M. (1999). Dose response models for infectious gastroenteritis. *Risk Analysis, 19*(6), 1251-1260. https://doi.org/10.1023/A:1007055316559

-The Pool Water Treatment Advisory Group (PWTAG - UK). (n.d.). Standards and guidance for pool operators. Obtenido de https://www.pwtag.org/

-U.S. Environmental Protection Agency. (2004). *Long Term 1 Enhanced Surface Water Treatment Rule (LT1ESWTR) implementation guidance* (EPA 816-R-04-008). Office of Water. https://www.epa.gov/dwreginfo/long-term-1-enhanced-surface-water-treatment-rule-documents

-United States Environmental Protection Agency. (2001). *Cryptosporidium: Drinking water health advisory*. Office of Science and Technology, Office of Water. https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/cryptosporidium-report.pdf.

-Wallis, P. M. (Ed.). (2002). Giardia: The Cosmopolitan Parasite. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 217-238.

-Watier-Grillot, S., Costa, D., Petit, C., Razakandrainibe, R., Larréché, S., Tong, C., Demont, G., Billetorte, D., Mouly, D., Fontan, D., Velut, G., Le Corre, A., Beauvir, J. C., Mérens, A., Favennec, L., & de Santi, V. P. (2022). Cryptosporidiosis outbreaks linked to the public water supply in a military camp, France. *PLoS Neglected Tropical Diseases, 16*(9), e0010776. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010776

-Widmer, G., Carmena, D., Kváč, M., Chalmers, R. M., Kissinger, J. C., Xiao, L., Sateriale, A., Striepen, B., Laurent, F., Lacroix-Lamandé, S., Gargala, G., & Favennec, L. (2020). Update on Cryptosporidium spp.: Highlights from the Seventh International Giardia and Cryptosporidium Conference. *Parasite, 27*, 14. https://doi.org/10.1051/parasite/2020011

-World Health Organization. (2009). Evaluación del riesgo de Cryptosporidium en agua potable. Obtenido de https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HSE-WSH-09.04

-World Health Organization. (2009). Risk assessment of Cryptosporidium in drinking-water.

-World Health Organization. (2016). Quantitative microbial risk assessment: Application for water safety management. World Health Organization. Obtenido de https://apps.who.int/iris/handle/10665/246195

-Zahedi, A., & Ryan, U. (2020). Cryptosporidium – An update with an emphasis on foodborne and waterborne transmission. *Research in Veterinary Science, 132*, 500–512. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.002

Madrid, octubre 2025

Esta guía ha sido elaborada por técnicos cuya participación ha sido voluntaria y "pro bono", gestionando el grupo de trabajo con fondos propios de la Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral.