



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudio sobre la transmisión hídrica de la criptosporidiosis y
posibles métodos de prevención

Study on water transmission of cryptosporidiosis and methods
of prevention

Autor

Leire Rodríguez Núñez

Director/es

Juan Manuel Martínez
Rodríguez

Joaquín Quílez Cinca

Facultad de Veterinaria

2024

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Taxonomía	3
3.2 Ciclo biológico	3
3.3 Epidemiología e importancia en salud pública	5
3.4 Evolución de la criptosporidiosis humana en Europa	6
3.5 Transmisión hídrica	7
3.6 Sintomatología en humanos	9
3.7 Métodos de diagnóstico	10
3.8 Tratamiento del agua de consumo	10
3.9 Tratamiento de aguas recreativas	11
3.10 Alternativas a los tratamientos convencionales de aguas	12
3.10.1 Pulsos eléctricos de alto voltaje	12
3.10.2 Tratamientos ultravioleta	14
3.11 Otras medidas de prevención	16
4. OBJETIVOS	17
5. METODOLOGÍA	18
5.1 Obtención de los ooquistes de <i>Cryptosporidium</i>	18
5.2 Tratamiento PEF	18
5.3 Tratamientos por UV-C	19
5.4 Estudio de la viabilidad de los ooquistes de <i>Cryptosporidium</i>	19
5.5 Análisis estadístico de los datos	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
6.1 Estudio de la viabilidad de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> mantenidos en refrigeración a lo largo del tiempo	21
6.2 Evaluación del tratamiento de radiación UV-C en la inactivación de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i>	23
6.3 Evaluación de la intensidad del tratamiento de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje en la inactivación de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i>	25
6.4 Evaluación de la temperatura de aplicación del tratamiento de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje en la inactivación de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i>	27
6.5 Evaluación de la combinación del tratamiento de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje y la radiación UV-C en la inactivación de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i>	29
7. CONCLUSIONES	31

8.	CONCLUSIONS	31
9.	VALORACIÓN PERSONAL	32
10.	BIBLIOGRAFÍA	32

1. RESUMEN

Cryptosporidium es un parásito protozoo zoonótico de transmisión feco-oral, ya sea por contacto directo con animales, personas infectadas, tras la ingestión de alimentos o agua contaminada. La dosis infectiva es muy baja y aunque en los individuos sanos ocasiona un cuadro de diarrea acuosa, la criptosporidiosis puede ser mortal en pacientes inmunodeprimidos. Teniendo en cuenta que los brotes epidémicos son cada vez más frecuentes, sobre todo los asociados a aguas de bebida o aguas recreativas contaminadas, la investigación sobre los diferentes métodos de inactivación de estos patógenos es un desafío de gran actualidad.

Se han analizado los artículos publicados en los últimos años sobre dicha materia, repasando y actualizando la información sobre epidemiología, importancia en salud pública, brotes tanto en España como en la U.E, transmisión del parásito y especialmente, las publicaciones más recientes sobre tratamientos del agua. Además, en la parte experimental del trabajo, se han realizado diversos ensayos con ooquistes purificados de *Cryptosporidium* de origen animal, para determinar la pérdida de viabilidad como consecuencia de la aplicación de diferentes tecnologías: los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF) y la irradiación UV-C, así como la combinación de ambas aplicadas a diferentes intensidades y temperaturas. El grado de inactivación de los ooquistes se evaluó mediante tinción con colorantes vitales.

En las diferentes pruebas del estudio experimental del TFG se utilizó un aislado de ooquistes de *Cryptosporidium*, concentrados y purificados a partir de terneros infectado de forma natural. El porcentaje de inactivación fue mayor tras el tratamiento de irradiación UV-C de mayor intensidad (210 mJ/cm^2) frente al de menor intensidad (28 mJ/cm^2). Después del tratamiento más moderado se consiguió inactivar aproximadamente un 40 % de los ooquistes, mientras que, tras el tratamiento más intenso, la inactivación aumentó hasta el 80 %. Por otro lado, el tratamiento PEF de 25 kV/cm produjo la inactivación del 45 % de los ooquistes de *Cryptosporidium*, mientras que el tratamiento más intenso (31,2 kV/cm) inactivó el 50%. El aumento de la temperatura de aplicación de los PEF desde los 25 ºC a los 40º se tradujo en un incremento del porcentaje de inactivación desde el 45 % al 62 %. Por último, se observaron diferencias estadísticamente significativas al combinar la irradiación UV-C con el tratamiento de PEF más intenso (31,2 kV/cm) respecto a la aplicación única de los PEF a la misma intensidad, consiguiéndose un efecto sumatorio.

Tanto los tratamientos UV-C como los PEF resultan adecuados para inactivar ooquistes de este parásito, incluso en combinación con otras tecnologías, sin embargo, en las condiciones

estudiadas no son suficientes para inactivar la totalidad de los mismos, por lo que en un futuro serán necesarias nuevas aportaciones en esta línea de investigación.

Palabras clave: *Cryptosporidium*, criptosporidiosis, métodos de desinfección, transmisión hídrica, PEF, Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje, UV-C, protozoos, brotes.

2. ABSTRACT

Cryptosporidium is a zoonotic protozoan parasite transmitted through the fecal-oral route, either by direct contact with infected animals or humans, or by consuming contaminated food or water. The infectious dose is very low, and although healthy individuals often show no symptoms, the most common manifestation is watery diarrhea, which can be fatal in immunocompromised patients. Considering the increasing frequency of epidemic outbreaks, especially those linked to contaminated drinking or recreational water, researching various methods to inactivate these pathogenic parasites is a crucial challenge.

Recent articles on this topic have been reviewed to update information on epidemiology, public health significance, outbreaks in Spain and the EU, parasite transmission, and especially the latest advancements in alternative water treatments. Additionally, in the experimental part of the study, various tests were conducted with purified *Cryptosporidium* oocysts of animal origin to determine the loss of viability due to different technologies: Pulsed Electric Field (PEF) and UV-C irradiation, as well as their combination at different intensities and temperatures. The degree of oocyst inactivation was measured using vital dye staining.

In the different tests of the TFG experimental study, an isolate of *Cryptosporidium parvum* oocysts was used, concentrated and purified from a naturally infected calf. The inactivation percentage was higher after the higher intensity UV-C irradiation treatment (210 mJ/cm²) compared to the lower intensity (28 mJ/cm²). The moderate treatment inactivated approximately 40% of the oocysts, while the more intense treatment increased inactivation to 80%.

On the other hand, the PEF treatment at 25 kV/cm resulted in 45% inactivation of *Cryptosporidium* oocysts, while the more intense treatment (31.2 kV/cm) resulted in 50% inactivation. Additionally, increasing the application temperature of the PEF from 25 to 40°C increased inactivation from 45% to 62%.

Finally, statistically significant differences were observed when combining UV-C irradiation with the most intense PEF treatment (31.2 kV/cm) compared to the sole application of PEF at the same intensity, achieving an additive effect.

Both UV-C treatments and PEF may be effective in deactivating oocysts of this parasite, either individually or in combination with other technologies. However, current findings suggest they are insufficient to fully prevent transmission. Hence, further research is crucial to enhance these methods for more effective mitigation.

Keywords: *Cryptosporidium*, cryptosporidiosis, disinfection methods, waterborne transmission, pulsed electric fields, PEF, UV-C, protozoa, outbreaks.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Taxonomía

Cryptosporidium spp. es un parásito protozoo intracelular perteneciente al phylum *Apicomplexa*, clase *Sporozoa*, subclase *Coccidiasina*, orden *Eucoccidiorida*, suborden *Eimeriorina* y familia *Cryptosporidiidae*, identificado por primera vez por Ernest Edward Tyzzer en ratones en 1907.

Gracias al empleo de herramientas moleculares se han reconocido 42 especies diferentes, entre las que destacan *C. hominis* y *C. parvum*, consideradas responsables de la mayoría de las infecciones en humanos (Zahedi y Ryan, 2020).

C. hominis es una especie de transmisión preferentemente antroponótica, aunque su presencia se ha denunciado esporádicamente en diversos animales. Por el contrario, *C. parvum* es una especie potencialmente zoonótica, pudiendo infectar a una gran diversidad de mamíferos, entre los que destacan los rumiantes, además del ser humano. Cabe destacar que *Cryptosporidium* es un parásito de distribución ubicua, con una baja dosis infectante (132 ooquistes para *C. parvum* y 10-83 para *C. hominis*) y elevada resistencia a los desinfectantes utilizados para potabilizar el agua de bebida, lo que lo convierte en el protozoo de transmisión hídrica más prevalente en los países desarrollados (Costa et al.,2020).

3.2 Ciclo biológico

Cryptosporidium spp. infecta las células epiteliales del tracto gastrointestinal de vertebrados. Su ciclo biológico es monoxeno y por tanto se desarrolla íntegramente en el mismo hospedador (Figura 1). La infección se produce por vía oral, mediante la ingestión de alimentos

o agua contaminados con ooquistes y al llegar al estómago, se liberan cuatro esporozoítos que invaden los enterocitos. En esta fase de desenquistamiento, los factores más influyentes son las sales biliares, la temperatura corporal (alrededor de 37°C) y la tripsina (De Felice et al.,2023). Una vez en el interior de las células epiteliales del intestino, tienen lugar dos ciclos de reproducción asexual (merogonia o esquizogonia), que generan numerosos merozoítos y ocasionan una intensa destrucción del epitelio cuando éstos se liberan a la luz intestinal.

A continuación, se produce una reproducción sexual (gametogonia) que genera microgametos y macrogametos, cuya fusión da como resultado un cigoto, que se rodea de una pared para formar el estadio de resistencia u ooquiste. La última etapa del ciclo es la esporogonia, que a diferencia de otros coccidios es intracelular y da lugar a la formación de 4 esporozoítos haploides dentro de cada ooquiste. La mayoría de los ooquistes tienen pared gruesa y se eliminarán con las heces, pudiendo ser ingeridos por otro hospedador y el ciclo empezará de nuevo. No obstante, aproximadamente el 20% de los ooquistes tienen una pared fina que se rompe antes de ser excretados en las heces, pudiendo infectar nuevas células y siendo responsables del fenómeno de autoinfección.

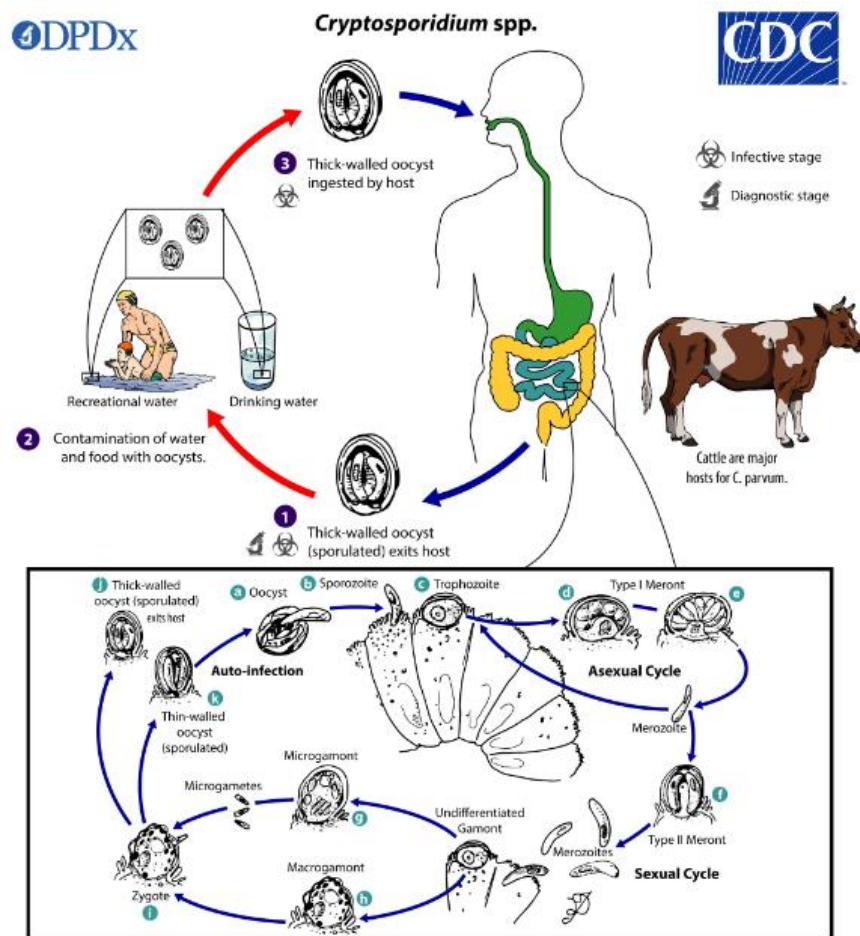


Figura 1: Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp (Centers for Disease Control and Prevention, 2024).

3.3 Epidemiología e importancia en salud pública

Entre las enfermedades de transmisión alimentaria recogidas por la OMS en 2012, se incluyó una relación de 24 parásitos sobre los que dicho organismo aconsejaba intensificar el control a nivel mundial. Entre todos ellos, en Europa se dio prioridad a *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*, *Echinococcus multilocularis*, *E. granulosus* y *Cryptosporidium spp.* La prevalencia global de criptosporidiosis en población humana es de 7,6%, aunque dicha cifra se incrementa en países en vías de desarrollo hasta 31,5%, con una media de 10,4%. La prevalencia en los países desarrollados oscila entre 0,1 y 14,1%, con una estimación promedio de 4,3% (García y Hayman, 2023).

La criptosporidiosis es una enfermedad de declaración obligatoria (EDO) en los siguientes países de la Unión Europea: Alemania, Austria, Bélgica, Dinamarca, España, Estonia, Finlandia, Francia, Hungría, Irlanda, Italia, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Países Bajos, Polonia, República Checa y Suecia. A estos países hay que añadir Noruega y Suiza, que si bien no forman parte de la UE participan en el Sistema Europeo de Vigilancia. En España es una enfermedad de declaración obligatoria desde marzo de 2015 y su registro se lleva a cabo en el Centro Nacional de Epidemiología (CNE, Instituto de Salud Carlos III- ISCIII) (Figura 2).

Los principales factores de riesgo en la transmisión de la enfermedad son el contacto con animales y humanos infectados, el contagio intrafamiliar y en instituciones cerradas como guarderías, la ingestión de alimentos o agua contaminados, tanto agua de bebida como aguas de uso recreativo, las condiciones de saneamiento e higiene deficientes y los viajes a zonas endémicas (Bouزيد et al.,2018).

En cuanto a los grupos de riesgo, destacan principalmente los niños menores de 5 años de países en vías de desarrollo, en los que la criptosporidiosis es la segunda causa más común de mortalidad relacionada con la diarrea, después de las infecciones por rotavirus (Reh et al.,2019). El impacto de la enfermedad es también mayor en estos países debido al saneamiento deficiente, las limitaciones en el acceso a agua potable y las dificultades en la atención sanitaria y diagnóstico, por lo que las tasas de mortalidad y morbilidad son mayores (Pane y Putignani, 2022).

Además, esta enfermedad tiene especial importancia en personas inmunodeprimidas como pacientes infectados por el VIH, aquéllos que han recibido algún tipo de trasplante o están desnutridos, en los cuales se agravan los síntomas y se incrementa la mortalidad, que puede llegar hasta el 70 % en seropositivos al VIH (Doménech et al, 2022). Por otra parte, *Cryptosporidium* es también prevalente en niños en edad preescolar de países desarrollados.

Sin embargo, es posible que las cifras oficiales solo presenten una fracción de la incidencia real, ya que los casos asintomáticos no suelen notificarse o pueden estar infra-diagnosticados (Reh et al.,2019).

En cuanto a la estacionalidad de la criptosporidiosis, se ha descrito un aumento de casos en Europa a finales de primavera y finales de verano-principios de otoño, coincidiendo con el aumento de viajes y el uso de piscinas (Costa et al.,2020). Cabe destacar que un brote de esta enfermedad en aguas recreativas puede provocar un enorme número de casos, ya que una persona infectada puede excretar 10^7 - 10^8 ooquistes en un incidente diarreico en el agua y éstos pueden sobrevivir más de 7 días a las concentraciones recomendadas de más de 1 ppm. de cloro libre disponible en aguas de piscinas (Gharpure et al.,2019). Las fuertes lluvias y otros fenómenos meteorológicos también pueden empeorar la calidad de las reservas de agua y traducirse en un incremento del número de casos (Franceschelli et al.,2022).

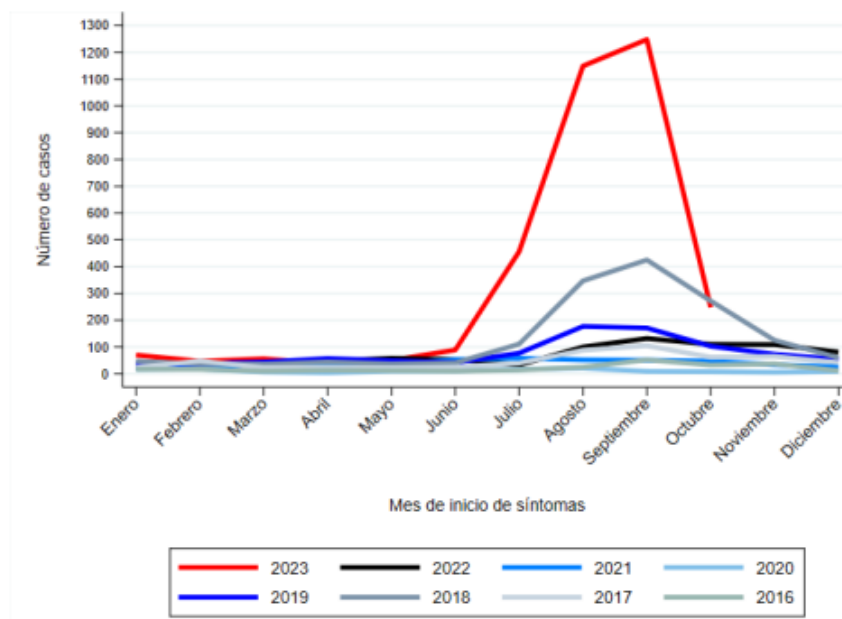


Figura 2: Distribución mensual de casos de criptosporidiosis en España (Ministerio de Sanidad- Dirección General de Salud Pública, 2023).

3.4 Evolución de la criptosporidiosis humana en Europa

Como se ha mencionado anteriormente, la criptosporidiosis es una emergencia sanitaria mundial, especialmente para niños y pacientes inmunocomprometidos. Según el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), en 2018 se produjo un incremento de casos en comparación con años anteriores, notificándose un total de 4.252 casos en 20 países de la Unión Europea. El 76% de los mismos se

denunciaron en Alemania, Países Bajos, España y Reino Unido, con una media de 4,4 casos por 100.000 habitantes (Pane y Putignani, 2022).

El año pasado también se constató un incremento de casos de criptosporidiosis en Irlanda, Luxemburgo, Reino Unido y los Países Bajos, desde finales de agosto hasta alcanzar el máximo en septiembre. Este aumento se relacionó con condiciones climáticas extremas como fuertes lluvias, inundaciones y olas de calor, así como el incremento de viajes (European Centre for Disease Prevention and Control, Solna, Sweden, 2023).

Este incremento también se constató en España en 2023, con un total de 3.400 casos, en comparación con los 4.739 registrados en nuestro país entre 2016 y 2022. La mayoría de casos denunciados el año pasado estuvieron asociados a brotes acontecidos en piscinas o al consumo de agua de las redes de abastecimiento (Ministerio de Sanidad- Dirección General de Salud Pública, 2023). Por el contrario, y al igual que ocurrió con otras enfermedades gastrointestinales en la Unión Europea, la cifra de casos de criptosporidiosis notificados en 2020 fue mucho menor que en los años previos, circunstancia relacionada con las restricciones globales por la pandemia de COVID-19 y las consiguientes medidas en cuanto a fomento de la higiene de manos, reducción de viajes, menor mezcla social y el cierre de instalaciones relacionadas con la transmisión como piscinas.

A partir de 2021 volvieron a aumentar significativamente los casos (Bacchetti et al., 2023), ya que tanto la respuesta inmune adaptativa como el sistema inmunológico general de la población se debilitaron notablemente debido a una menor exposición al parásito. Además, un estudio realizado en 2023 por la Universidad de El Cairo demostró que la gravedad de la criptosporidiosis era mayor en pacientes con antecedentes de COVID-19 en comparación con personas que no habían estado infectadas por el virus, como consecuencia del aumento de biomarcadores inflamatorios, específicamente factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y calprotectina fecal (FCAL), así como el efecto inmunosupresor del COVID-19 (Enas et al., 2023).

3.5 Transmisión hídrica

Una de las principales vías de contagio de la criptosporidiosis humana es el agua contaminada. Aunque los ooquistes no se multiplican en el agua, su pequeño tamaño les permite escapar a los tratamientos convencionales de filtración y pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo expuestos al cloro y otros productos químicos normalmente utilizados para la potabilización del agua de consumo (Augendre et al., 2023).

Un estudio sobre los brotes transmitidos por agua (Moreira y Bondelind, 2017) indica que las principales causas de contaminación del agua potable y por tanto de transmisión de parásitos son, entre otras: la descarga de aguas residuales a la fuente de agua tanto superficial como subterránea, el aumento de color y turbidez del agua, razones técnicas como fallos en la desinfección y deficiencias en el equipo de cloración o tratamiento UV y causas relacionadas con la red de distribución como roturas de tuberías, contaminación de embalses o conexiones cruzadas. Entre los numerosos brotes notificados en países desarrollados destacan los acontecidos en la primavera de 1993 en la ciudad norteamericana de Milwaukee, con más de 400.000 personas afectadas, así como los 47.000 casos notificados en Suecia entre 2010 y 2011 (García y Hayman, 2023). Entre 2011 y 2016, en todo el mundo se denunciaron un total de 381 brotes de gastroenteritis de origen hídrico y etiología parasitaria, siendo *Cryptosporidium spp.* responsable del 63% de los mismos (Cullinan et al., 2020). (García y Hayman, 2023).

Entre los brotes de criptosporidiosis humana de origen hídrico acontecidos en nuestro país, cabe destacar el declarado en la localidad zaragozana de Tarazona en 2023, relacionado con la contaminación de las aguas del río Queiles de las que se abastece la ciudad y municipios limítrofes. En total se notificaron más de 500 afectados a lo largo de 47 días en los que el consumo del agua de la red estuvo restringido. Concretamente, el episodio de gastroenteritis se declaró el fin de semana del 9 al 10 de septiembre del 2023, por lo que, en aplicación del Decreto 265/2023 de 25 de octubre del Gobierno de Aragón, se implantaron restricciones en el consumo de agua de abastecimiento del municipio de Tarazona, así como en Torrellas, Novallas y Los Fayos (NTM/ EFE, 2023). Como medida de control para prevenir brotes futuros, la administración autonómica y local implantó un sistema de tratamiento de luz ultravioleta (UV) en la Estación de Tratamiento de Agua Potable (ETAP) de Tarazona. El sistema funciona desde el 20 de noviembre de 2023 y cuenta con lámparas de mercurio de baja presión que emiten luz concentrada al 90 % (Ayuntamiento Tarazona, s.f.).

Otro importante foco de transmisión hídrica de la criptosporidiosis responsable de numerosos brotes es la ingestión accidental de aguas en piscinas o instalaciones acuáticas recreativas contaminadas previamente por personas que han utilizado dichos servicios. La infección en este caso se considera más probable en las piscinas para niños, donde es más frecuente la liberación accidental de materia fecal y el bajo volumen de agua compromete su calidad (Cullinan et al., 2020). De hecho, se calcula que un incidente de contaminación fecal en una piscina de $450m^3$ puede suponer la liberación de unos 20.000 ooquistes por litro. Si se estima que en 45 minutos en una piscina los niños ingieren un promedio de 37 ml de agua y los

adultos 16 ml, un nadador que trague tan solo 10 ml de agua podría ingerir 200 ooquistes, lo que resulta muy superior a la dosis mínima infectante (<100 ooquistes) (Wood et al., 2019).

3.6 Sintomatología en humanos

La criptosporidiosis se manifiesta como una gastroenteritis aguda con un periodo de incubación medio de 7 días (1-10 días). El curso clínico se caracteriza por diarrea acuosa profusa, junto con otros síntomas como calambres abdominales, náuseas, debilidad muscular, febrícula o anorexia. La sintomatología se resuelve espontáneamente en 2-3 semanas en personas inmunocompetentes, aunque puede prolongarse en bebés y pacientes inmunocomprometidos, en los que podría ser potencialmente mortal (Watier-Grillot et al., 2022).

Por otro lado, hay estudios que sugieren que la criptosporidiosis puede tener también efectos negativos para la salud a largo plazo que incluyen: dolor abdominal, vómitos, diarrea, pérdida del apetito, síndrome del intestino irritable, artritis-reactiva, pancreatitis aguda, dolor de las articulaciones y fatiga, síndrome urémico hemolítico o síndrome de *Reiter* (Carter et al., 2020). No obstante, cabe destacar que algunas personas infectadas son asintomáticas, por lo que en ellas se dificulta el diagnóstico.

En la siguiente Figura se observan los hallazgos de un estudio clínico en el que 77 % de los casos presentaron diversos síntomas (582/750), y se registraron 7 fallecimientos, todos ellos en pacientes inmunocomprometidos (Costa et al., 2020).

Symptom	Number of Cases	Proportion (%)
Diarrhea	569	98
Fever	128	22
Nausea	124	21
Weight loss	155	27
Dehydration	86	15
Abdominal pain	257	44
Vomiting	143	25
Respiratory signs	10	2
Increased CRP	57	10
Altered liver function	29	5
Others *	46	8

* Asthenia, myalgia, constipation and bloody stools.

Figura 3: Síntomas registrados en los casos notificados de criptosporidiosis (Costa et al, 2020).

La inmunidad frente a *Cryptosporidium spp.*, se debe a respuestas inmunes tanto adaptativas como innatas. Esta última se produce gracias a células dendríticas, NK, quimiocinas, óxido nítrico sintasa, receptores de tipo Toll y macrófagos; mientras que la adaptativa la producen principalmente los linfocitos B y T. Los linfocitos Th1 CD4 producen INF- γ , IL-2, IL-12 y TNF que actúan contra parásitos intracelulares con la ayuda de Th2. Se han descrito infecciones más

graves en personas con un recuento de CD4 menor a 200 células por mm^3 (Vanathy et al., 2017).

3.7 Métodos de diagnóstico

El diagnóstico microscópico de la criptosporidiosis en las muestras fecales requiere métodos de concentración (flotación y sedimentación), así como múltiples técnicas de tinción, debido al pequeño tamaño de los ooquistes. A su vez, se recomienda tomar tres muestras fecales recogidas en días diferentes ya que la detección de los ooquistes puede ser intermitente (Gerace et al., 2019). La detección del parásito en el agua es compleja, estando estandarizados únicamente dos métodos (ISO 15553 y USEPA1623) muy semejantes en cuanto a su metodología, que incluye inicialmente la retención de ooquistes mediante filtros especialmente desarrollados con esta finalidad, su recuperación posterior mediante separación inmunomagnética con anticuerpos monoclonales y la detección al microscopio por inmunofluorescencia.

Por otro lado, para saber el genotipo o especie de *Cryptosporidium* resultan imprescindibles las técnicas moleculares, ya que los ooquistes de la mayoría de especies son morfológicamente indistinguibles al microscopio. La amplificación por PCR o qPCR de un fragmento del gen de la pequeña subunidad ribosomal (su ARN) es la herramienta más común para identificar la especie, tanto en heces como en muestras de origen ambiental (Zahedi y Ryan, 2020; Watier-Grillot et al., 2022).

3.8 Tratamiento del agua de consumo

El agua es un recurso imprescindible para la vida que puede tener consecuencias de gravedad y especial magnitud para las personas que la ingieren en caso de estar contaminada por microorganismo patógenos, por lo que se somete a procesos de desinfección para eliminarlos o inactivarlos. En las estaciones potabilizadoras, el agua se somete a distintos procesos como la coagulación, sedimentación, filtración y desinfección (Figura 4) (Kristanti et al., 2022).

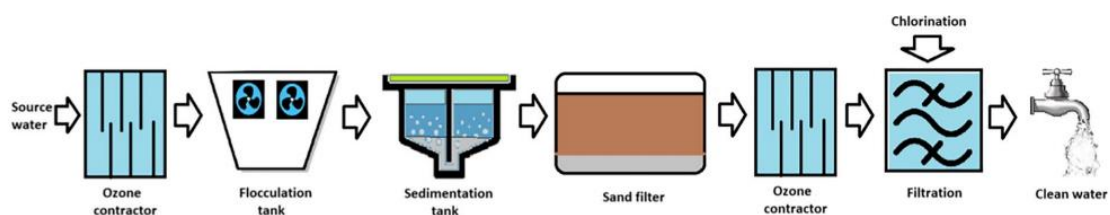


Figura 4: Procesos de tratamiento de agua más utilizados (Kristanti et al, 2022).

El cloro y el ozono son los químicos más comúnmente utilizados en la potabilización del agua, con efecto oxidante sobre la membrana celular de los microorganismos. Este último, a pesar de no dejar residuos en el agua, tiene como inconveniente que contamina el aire y además es irritante para la piel, sistema respiratorio, ojos y membranas mucosas. El cloro es barato y fácil de utilizar, pero tiene efecto irritante sobre las mucosas y aporta un sabor desagradable al agua en caso de utilizarse en exceso.

Un estudio que compara la eficacia del cloro para inactivar *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua (Adeyemo et al., 2019) afirma que los ooquistes de *Cryptosporidium* son más resistentes al cloro que los quistes de *Giardia*, por lo que necesitarán mayores dosis y tiempo de exposición. Sin embargo, se ha demostrado que dicho tiempo de exposición tiene un umbral, a partir del cual, aunque se siga aumentando la exposición, el cloro no tendrá mayor efecto sobre la viabilidad del parásito.

Otros métodos utilizados son la destilación, técnica que consiste en calentar el agua contaminada hasta la ebullición. El calor inactiva el microorganismo y el vapor producido entra en una sección de enfriamiento para pasar nuevamente a un estado líquido al que se le han podido eliminar hasta el 99,5 % de las impurezas. No obstante, la destilación presenta como gran inconveniente el ingente gasto de energía además de la necesidad de un mantenimiento cuidadoso de los equipos (Kristanti et al., 2022). En cualquier caso, un método culinario para desinfectar agua contaminada pasa por hervirla durante 5 minutos.

Por otra parte, los ooquistes de *Cryptosporidium spp.* son difícilmente retenidos mediante los sistemas de filtración más comunes, ya que su diámetro es de tan sólo 4-5 μm , mientras que el umbral de corte de los sistemas de filtración con arena (los utilizados normalmente para tratamiento de aguas) es de unas 10 μm (Watier-Grillot et al., 2022).

En definitiva, invertir en la investigación de nuevos métodos de potabilización del agua o en la mejora de los ya existentes en relación a este parásito es imprescindible. La aparición de brotes relacionados con el agua de bebida, además de producir un gran impacto en salud pública debido a los gastos médicos de tratamientos y hospitalizaciones y las posibles secuelas e incluso muertes, puede reducir la confianza del consumidor, disminuir la aceptación por dicha agua y aumentar el riesgo percibido.

3.9 Tratamiento de aguas recreativas

Los principales tratamientos del agua en piscinas incluyen generalmente una combinación de filtros presurizados para eliminar los sólidos en suspensión, con el fin de mantener la claridad

del agua, junto con un biocida para inhibir el crecimiento o inactivar microorganismos. El diámetro de poro de los filtros es de 600-800 μm y normalmente contienen arena, aunque también pueden contener vidrio reciclado triturado. Entre los biocidas más comunes destaca el hipoclorito sódico, así como tratamientos físicos como la luz ultravioleta o físico-químico mediante electrólisis salina (Ministerio de Sanidad, 2022) (Figura 5).

Las industrias de tratamiento de agua afirman que la combinación de floculación/coagulación, filtración y sedimentación pueden llegar a eliminar entre el 97,2 y el 99,9% de los ooquistes. No obstante, debido a la ausencia de sedimentación efectiva y de coagulación, la eliminación de ooquistes en aguas recreativas suele ser menos efectiva (Wood et al., 2019).

Se estima que los ooquistes de *Cryptosporidium* pueden sobrevivir en el agua de una piscina entre 3,5 y 10,6 días a los niveles de cloro recomendados (1-3 mg/L) ya que son altamente tolerantes a dicho compuesto por lo que el correcto control y mantenimiento de los filtros es crucial para evitar brotes (Ortiz et al., 2020).

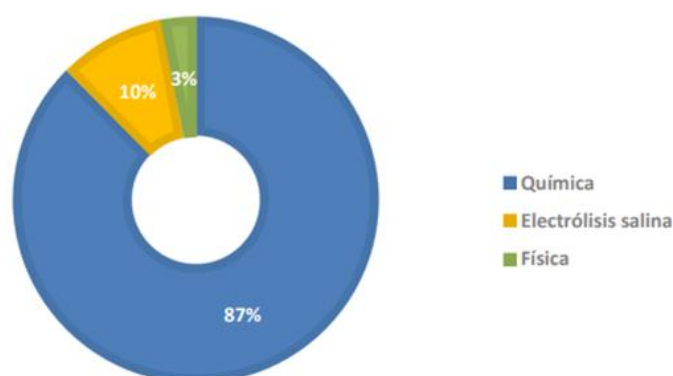


Figura 5: Distribución del tipo de desinfección utilizada (%) (Ministerio de Sanidad, 2022).

3.10 Alternativas a los tratamientos convencionales de aguas

3.10.1 Pulsos eléctricos de alto voltaje

Una de las alternativas físicas que este trabajo propone para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium* son los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF, de las siglas en inglés *Pulsed Electric Fields*). Aunque su uso está ampliamente extendido para la inactivación no térmica de bacterias en alimentos (Delso et al, 2022), esta tecnología apenas se ha aplicado hasta el momento para la inactivación de parásitos, exceptuando los estudios recientemente publicados con *Anisakis* y *Trichinella* (Abad et al., 2023) (Martínez et al., 2023). Sin embargo, estos estudios como parte del proyecto PARAFree financiado por el gobierno de Aragón y

coordinado por el profesor Ignacio Álvarez de la Universidad de Zaragoza, han suscitado gran impacto.

El pasado mes de abril, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, del inglés *European Food Safety Authority*) ha re-evaluado ciertos aspectos de su opinión científica de 2010 sobre evaluación de riesgos de parásitos en productos pesqueros y en su nueva publicación ha tenido en cuenta la aplicación de los PEF basándose en los nuevos datos científicos (EFSA Panel on Biological Hazards, BIOHAZ, 2024). De todos modos, estos últimos estudios de inactivación mediante PEF de parásitos se han centrado en la inactivación de larvas de nematodos, mientras que, según las fuentes consultadas, hay escasa información sobre el efecto de los PEF en estas formas infectantes de protozoos, exceptuando el trabajo de Haas y Aturalie, (1999). Sin embargo, transcurridos 25 años desde este estudio, los equipos de PEF han mejorado enormemente y las posibilidades de tratamiento son mucho mayores hoy en día.

Los tratamientos de PEF consisten en someter a un producto colocado entre dos electrodos, normalmente inmerso en una solución acuosa, a campos eléctricos de alta intensidad (entre 0,5 y 30 kV/cm) mediante la aplicación intermitente de pulsos de corta duración (microsegundos a milisegundos) sin incrementar la temperatura del producto.

Si la intensidad del campo eléctrico es lo suficientemente elevada se produce un fenómeno denominado electroporación, que consiste en el incremento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática al paso de iones y macromoléculas (Kotnik et al., 2012). Cuando se produce la electroporación, y dependiendo de la intensidad de tratamiento, la célula puede ser capaz de volver a sellar los poros (electroporación reversible) o por el contrario, los poros se vuelven permanentes (electroporación irreversible). Debido a la pérdida de la homeostasis celular por la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana citoplasmática, puede llegar a producirse la inactivación de la célula (Martínez et al., 2023). En concreto, cuando se trata de aplicar esta tecnología para inactivar microorganismos, el efecto que se busca es la electroporación irreversible para disminuir la viabilidad de las células a las que se desea inactivar.

El desarrollo de ingeniería en esta tecnología se ha acelerado en los últimos años y actualmente existen grandes equipos comerciales de PEF implantados en la industria que funcionan en flujo continuo. Por ejemplo, estos equipos a gran escala se usan desde hace años para el procesado de patatas fritas o la pasterización fría de zumos de frutas (Barba et al., 2015). Además, más recientemente se han empezado a utilizar los PEF para otra serie de aplicaciones en la industria, como por ejemplo la extracción de polifenoles y otras sustancias

deseables de la uva en los procesos de vinificación. La Organización Internacional de la Viña y el Vino (*International Organisation of Vine and Wine*, OIV) admitió esta implementación en 2020 (OIV-OENO 634–2020). En estos casos se trabaja a flujos de miles de litros por hora, lo que podría acercarse a la magnitud de caudal de procesado necesario para el tratamiento de aguas.

El objetivo del presente trabajo sería conseguir la electroporación irreversible de las membranas celulares de *Cryptosporidium*, comprometiendo con ello su fisiología hasta el extremo de producir su inactivación y evitar su transmisión por la vía hídrica.

3.10.2 Tratamientos ultravioleta

Otra de las alternativas que proponemos estudiar es la irradiación con luz ultravioleta (UV). Aunque tradicionalmente se ha usado esta tecnología como método desinfectante para el aire, las superficies y la descontaminación de aguas, su combinación con la tecnología PEF en la inactivación de ooquistes nunca había sido estudiada.

La luz ultravioleta es la parte del espectro electromagnético que va de 200 a 400 nm y se divide en tres regiones: ultravioleta de onda corta (UV-C), de 200 a 280 nm; UV-onda media (UV-B), de 280 a 320 nm; y UV de onda larga (UV-A), de 320 a 400 nm. Sus efectos sobre el material genético son los principales responsables de la inactivación microbiana, aunque también pueden dañarse otros componentes celulares como las proteínas. Por esta circunstancia, la resistencia a la luz UV de un microorganismo específico depende de la eficacia de sus mecanismos de reparación del ADN, así como del grado de daño al ADN inducido por el tratamiento.

La UV-C constituye la región más germicida y el pico de máxima eficacia se produce en longitudes de onda de aproximadamente 260-265 nm, lo que corresponde con el pico de máxima absorción de ADN (Kowalski, 2009). La inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium* mediante irradiación UV-C es un método que ha sido ampliamente estudiado, debido a su eficacia en la desinfección del agua y la eliminación de patógenos. La radiación UV-C anula la capacidad del parásito para replicarse y por tanto para infectar al hospedador (Rochelle et al., 2005).

Se conocen cinco mecanismos de reparación del ADN de los protozoos: reparación por escisión de bases (BER), reparación de errores de coincidencia (MMR), reparación por escisión de nucleótidos (NER), recombinación homóloga (HR), vía de reversión directa del daño y unión de extremos de ADN no homólogo (NHE). Entre ellas, se puede destacar la reparación BER, que

corrige tanto pequeñas lesiones del ADN como las bases dañadas por desaminación u oxidación; la reparación MMR, que repara los errores de inserción/delección de base-base asociados a la replicación y también la Reparación NER, encargada de arreglar lesiones del ADN de mayor tamaño, como las provocadas por la radiación UV (Smolarz et al., 2014).

La efectividad de la UV-C depende de la dosis, que es el producto de la intensidad de la luz y el tiempo de exposición. Se ha encontrado que dosis específicas (generalmente medidas en mJ/cm^2) son necesarias para lograr una inactivación adecuada en diferentes condiciones. Sin embargo, la presencia de partículas en suspensión y otros materiales en el agua pueden reducir la eficacia de la UV-C al absorber o dispersar la luz, impidiendo que ésta llegue a los ooquistes. Por tanto, la turbidez del agua es un factor crítico, ya que el agua más clara permite una mejor penetración de la luz UV-C.

Pese a las citadas limitaciones y a diferencia de otros métodos de desinfección, como la cloración, la UV-C no deja residuos químicos y es eficaz contra los ooquistes de *Cryptosporidium* cuando se aplica en condiciones ideales (agua transparente y con lámparas colocadas en flujos pequeños). Sin embargo, la UV-C no proporciona un efecto residual, lo que significa que el agua se puede volver a contaminar después de la irradiación si no se toman medidas adicionales.

En la práctica, la irradiación UV-C se utiliza ampliamente en plantas de tratamiento de agua potable y en sistemas de purificación de agua a menor escala, como los purificadores domésticos. También se está explorando su uso en la industria alimentaria y en la agricultura para la desinfección de superficies y agua utilizada en riego.

La limitada letalidad microbiana de la luz ultravioleta en medios con alto coeficiente de absorción y turbidez, como pueden ser algunas aguas contaminadas, justifica la necesidad de desarrollar procesos combinados simultáneos o sucesivos. La tecnología UV se puede combinar con procesos convencionales y otros procesos no térmicos para mejorar sus efectos letales sobre los microorganismos. La letalidad de los tratamientos combinados puede deberse a efectos aditivos o sinérgicos. Los efectos letales sinérgicos son preferibles a la hora de diseñar procesos combinados porque permiten obtener un nivel específico de inactivación, reduciendo el aporte energético y la intensidad del tratamiento. Esta sinergia puede surgir cuando las estrategias de inactivación aplicadas actúan sobre el mismo objetivo vital, aumentando las posibilidades de daño irreversible, o cuando actúan en diferentes sitios, causando daño subletal en varias áreas de las células, aumentando su potencial letal general (Ross et al. 2003).

El diseño inteligente de tratamientos combinados requiere el conocimiento de los mecanismos de inactivación de cada tecnología a aplicar. En el caso de las bacterias se ha observado un efecto sinérgico al combinar la luz ultravioleta con calor suave, agentes químicos y radiación ionizante. Sin embargo, la combinación de luz ultravioleta con otras tecnologías no térmicas, como los ultrasonidos para la higienización de zumos de frutas, ha dado como resultado efectos de inactivación aditivos (Gayán et al., 2014). En el caso de los parásitos, estas combinaciones de tecnologías de inactivación están mucho menos estudiadas.

En una investigación realizada en el año 2020 (García-Gil et al., 2020) se comprobó que la temperatura y la radiación solar tenían un efecto sinérgico, obteniendo una tasa de inactivación de los ooquistes de *Cryptosporidium* significativamente mayor que los tratamientos individuales en menos tiempo, utilizando temperaturas de 50-60°C y longitudes de onda de aproximadamente 254 nm (UV-C). Por ello se determinó que un modelo cinético combinando tratamientos espectrales mediante la luz solar y tratamientos térmicos podría ser un buen enfoque para mejorar la calidad y seguridad del agua de bebida.

Hasta la fecha no hay estudios publicados de la combinación de los tratamientos de PEF con UV-C frente a parásitos. Por tanto, este trabajo evaluará si la irradiación UV-C es un método eficaz para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium*, dependiendo de la dosis aplicada y su posible combinación con los PEF y variaciones en la temperatura. El objetivo final es complementar su uso con otros métodos de desinfección, proporcionando una barrera adicional contra patógenos resistentes a otros tratamientos.

3.11 Otras medidas de prevención

Junto con el citado tratamiento de las aguas de consumo y de piscinas, la prevención de la criptosporidiosis se basa principalmente en el concepto One Health, que aboga por un enfoque de salud única en la que están estrechamente relacionadas la salud animal, humana y ambiental, centrándose en la reducción o eliminación de la contaminación del medio ambiente con ooquistes. Entre las fuentes de contagio de origen animal destacan las explotaciones ganaderas de rumiantes, donde *C. parvum* es una de las principales causas de diarrea neonatal. En las granjas afectadas resultan decisivas las medidas de limpieza y desinfección, junto con otras normas de higiene básicas como el lavado de manos tras mantener contacto con los animales, o el cambio de zapatos o ropa antes de entrar a otros entornos como los hogares (Zahedi y Ryan, 2020).

La recopilación periódica y análisis de datos epidemiológicos y de caracterización molecular es otra herramienta de control y prevención de la criptosporidiosis (Gharpure et al., 2019).

Actualmente, la falta de sistemas específicos de vigilancia, detección y notificación es una de las principales causas de que no se notifiquen los brotes en muchos países. Según un informe publicado el 16 de noviembre de 2023 por la Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad, los brotes deben notificarse rápidamente y de forma adecuada a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) y llevar a cabo un estudio epidemiológico para determinar su magnitud y fuentes de contagio con el fin de adoptar medidas correctoras. Cada comunidad autónoma, comunicará los casos confirmados en su territorio al Centro Nacional de Epidemiología (CNE) y al Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CAEES) que a su vez y en función de la gravedad, los notificarán a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y al Sistema de Alerta y Respuesta Rápida de Unión Europea (EWRS).

Por lo que respecta al tratamiento médico de la enfermedad, la nitazoxanina (agente antiparasitario de amplio espectro con efectividad comprobada en infecciones por protozoos y vermes) es el único fármaco aprobado por la Agencia Europea del Medicamento (EMA), la Administración de Medicamentos y Alimentos de EEUU (FDA) y la Agencia de Productos Farmacéuticos y Dispositivos Médicos (PMDA). Por otro lado, el uso de probióticos es una estrategia terapéutica alternativa para esta enfermedad, ya que se ha demostrado que bacterias como *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus casei* pueden promover la integridad intestinal en niños, prevenir daños mayores, mejorar la clínica y resolver la infección (Pane y Putignani, 2022). En pacientes con VIH la nitazoxanida no resulta eficaz, por lo que éstos se tratan mediante una terapia antirretroviral con el fin de mejorar su sistema inmunológico y aumentar los recuentos de CD4, reduciendo así los síntomas de la enfermedad (Vanathy et al., 2017).

4. OBJETIVOS

El principal objetivo de este estudio es evaluar experimentalmente varios métodos de inactivación de las formas infectantes (ooquistes) de *Cryptosporidium* en el agua, incluyendo el tratamiento PEF y la irradiación UV-C, así como la combinación de ambos y su aplicación a diferentes temperaturas. La pérdida de viabilidad de los ooquistes se ha evaluado en todos los casos utilizando una técnica con dos colorantes vitales (DAPI / PI). Para ello, previamente se ha realizado una labor de revisión bibliográfica, que ha servido de base para comprender las características e importancia en salud pública del parásito y las tecnologías aplicadas para poder diseñar los experimentos que persiguen los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la pérdida de viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* mantenidos en medio tampón en refrigeración varias semanas.

- Determinar la pérdida de viabilidad de ooquistes de *Cryptosporidium* como consecuencia del tratamiento PEF y la irradiación UV-C, utilizando una técnica de colorantes vitales con DAPI / PI.
- Investigar si la combinación de los anteriores métodos ofrece mejores resultados para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium* en comparación con su aplicación por separado.
- Investigar si la aplicación del tratamiento PEF a diferentes temperaturas modifica el porcentaje de inactivación de los ooquistes de *Cryptosporidium*.

5. METODOLOGÍA

5.1 Obtención de los ooquistes de *Cryptosporidium*

Los ooquistes se aislaron de heces de terneros de 7 días de vida infectados de forma natural en una granja de Aragón y con sintomatología evidente. Las muestras se recogieron en bolsas de plástico no estériles y fueron transportadas al laboratorio para su diagnóstico y procesado. Se determinó la presencia del parásito mediante examen en fresco y tinción negativa de Heine. Los ooquistes fueron concentrados y purificados mediante sucesivas centrifugaciones utilizando una técnica de sedimentación con PBS-éter dietílico. Los ooquistes así purificados fueron conservados en microtubos con una concentración de 2 millones ooquistes/ml.

5.2 Tratamiento PEF

El equipo de PEF utilizado en esta investigación fue un equipo comercial (Vitave, Praga, República Checa) capaz de liberar pulsos de hasta 20 kV. El equipo aplica pulsos monopolares de onda cuadrada de anchura variable (500 ns–100 μ s) hasta una intensidad de corriente máxima de 500 A y permite trabajar a frecuencias de hasta 50 kHz. El voltaje real de cada tratamiento se midió utilizando una sonda de alto voltaje (Tektronik, P6015A, Wilsonville, Oregon, EE. UU.) conectada a un osciloscopio (Tektronik, TDS 220). Se introdujo una suspensión de ooquistes (0,44 ml con conductividad de 1 mS/cm) en una cámara de tratamiento estática de electrodos paralelos con dimensiones específicas (espacio: 0,25 cm; diámetro: 1,6 cm) utilizando una jeringa estéril de 1 ml (TERUMO, Lovaina, Bélgica) con una aguja 20Gx 1" (0,9 x 25 mm) (TERUMO). Las muestras para la investigación del efecto del PEF en los ooquistes se sometieron a 30 pulsos de onda cuadrada de 3 μ s de diferentes intensidades de campo eléctrico (25 y 31,2 kV/cm). Estos tratamientos correspondieron a energías específicas que oscilaron entre 900 y 1400 kJ/kg. Los experimentos con ooquistes control y tratados se realizaron por duplicado. Las muestras tratadas con PEF se procesaron inmediatamente para

observación microscópica con el fin de minimizar el lapso de tiempo entre el tratamiento y la evaluación.

5.3 Tratamientos por UV-C

El equipo de luz UV-C utilizado es una instalación de diseño “flexible” con dos lámparas de luz UV-C de 32 W (modelo VL-208G, Vilber, París, Francia) dispuestas de forma horizontal. Consiste en una cabina cerrada en la que se deposita el alimento o muestra a tratar sobre una superficie de altura regulable. La instalación tiene además un sistema de refrigeración compuesto por dos extractores dispuestos en los laterales de la cámara.

Los tratamientos se caracterizaron mediante un radiómetro (UVP, LLC, Upland, CA) que mide de forma constante la irradiancia (mW/cm^2) y un termómetro con dos sondas que miden en continuo la temperatura en el interior de la cámara.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* se dispensaron en volúmenes de 100 μL en cada uno de los pocillos de las placas microtiter multipocillo de 96 y se colocaron debajo de las lámparas durante los diferentes tiempos de exposición estudiados. La placa se colocó en un agitador orbital funcionando a 300 rpm para evitar el efecto sombra.

Después de los tratamientos (tanto de PEF como UV-C y combinaciones) los ooquistes se recuperaron de cada uno de los pocillos y se realizaron las tinciones para poder evaluar por microscopía su viabilidad.

5.4 Estudio de la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium*

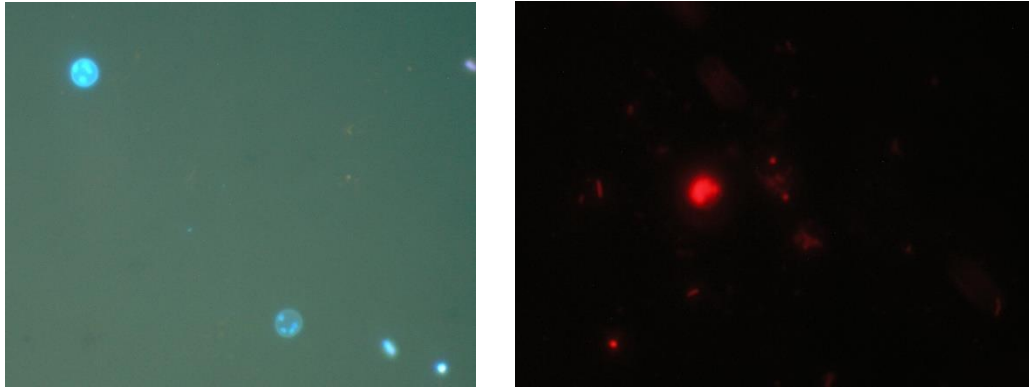
Para determinar la viabilidad de los ooquistes y su pérdida potencial tras exponerlos a los distintos tratamientos se utilizó una técnica *in vivo* basada en la inclusión/exclusión de los colorantes vitales 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) y yoduro de propidio (IP). En cada ensayo se utilizaron alícuotas de 2×10^6 ooquistes, que se depositaron en microtubos de 1,5 mL y preincubaron en solución salina de Hanks (HBSS) acidificada (pH 2,75) durante 1 hora a 37°C para optimizar la inclusión de los colorantes, realizando posteriormente 2 lavados con HBSS pH 7,2 para normalizar el pH.

Posteriormente se adicionó a cada microtubo 10 μL de solución de trabajo DAPI (2 mg/mL en metanol absoluto) y 10 μL de solución de trabajo de IP (1 mg/mL en PBS 0,1 M pH 7,2) y se incubaron a 37 °C durante 2 horas, seguido de 2 lavados con HBSS pH 4 para prevenir la formación de cristales de DAPI (Bukhari et al., 2018). Alícuotas (25 μL) de la suspensión ooquistica se examinaron al microscopio de fluorescencia con filtro ultravioleta (350-365 nm)

para DAPI y filtro verde (545-546 nm) para IP, determinando la proporción de ooquistes viables sobre un total de 100.

El porcentaje de viabilidad de los ooquistes control negativo (OC -) se corrige a 100% y el porcentaje de viabilidad de los ooquistes tratados (OT) se corrige por el mismo factor de la siguiente forma:

$$\text{OT corregido} = 100/\text{OC-observado} * \text{OT observado}$$



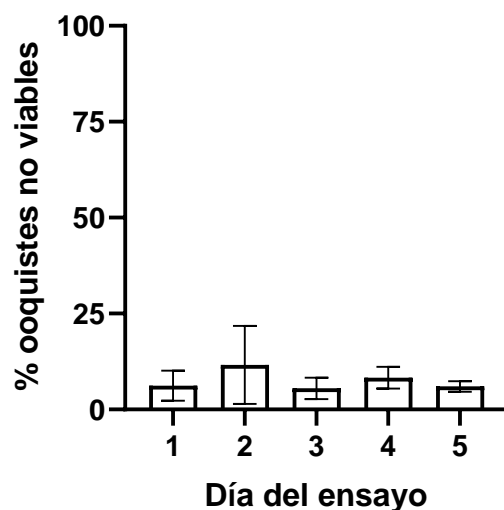
Figuras 6 y 7: Ooquistes viables (DAPI+) a la izquierda y ooquistes inactivados (IP+) a la derecha.

5.5 Análisis estadístico de los datos

Los resultados representan la media \pm la desviación estándar de tres réplicas de tratamientos realizados por triplicado. Los porcentajes de viables e inactivados fueron testados para ver si seguían una distribución normal con el test de Shapiro–Wilks. Se realizaron pruebas ANOVA unidireccionales para evaluar diferencias significativas entre los tratamientos. Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0.05$. Los gráficos y análisis estadísticos se han realizado con la versión gratuita del software GraphPad Prism 9.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Estudio de la viabilidad de ooquistes de *Cryptosporidium* mantenidos en refrigeración a lo largo del tiempo



*Figura 8: Porcentaje de ooquistes de *Cryptosporidium* no viables a lo largo de los diferentes días de realización de los ensayos.*

La figura 8 muestra el porcentaje de ooquistes no viables a lo largo de los diferentes días de la realización de los ensayos de inactivación. Esta prueba se realizó para comprobar si era posible trabajar con ooquistes purificados de terneros y almacenados en refrigeración y comparar los datos en los sucesivos días de ensayos. Se observa que siempre hay entre un 5 y un 10 % de ooquistes no viables en la suspensión de ooquistes purificados. Esto quiere decir que hay un pequeño porcentaje de ooquistes sin tratar que captan el yoduro de propidio pese a no haber recibido ningún tratamiento de inactivación, probablemente porque tienen dañada la membrana y permite la entrada del colorante fluorescente. En todo caso, los posteriores resultados de inactivación tras los tratamientos están corregidos respecto a este porcentaje residual de ooquistes control PI+.

Los datos obtenidos del porcentaje de ooquistes no viables para cada uno de los días no siguieron una distribución de Gauss por lo que se realizó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis. El valor p fue 0,8968 y por lo tanto las medianas no variaron significativamente, por lo que se puede concluir que los cinco grupos de datos no eran estadísticamente diferentes y por tanto, se concluyó que se podía trabajar para los estudios de inactivación con ooquistes purificados con diferentes tiempos de almacenamiento y comparar los datos.

Si asumiésemos que los datos siguen una distribución normal y tienen similar desviación estándar (lo que probablemente ocurriría realizando más réplicas y teniendo grupos de datos

más grandes), los grupos se podrían comparar mediante un ANOVA unidireccional. Los resultados del ANOVA que resultaría de analizar los cinco grupos de datos se muestran en la **Tabla 1**. No hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias, por lo que, en línea con el test Kruskal-Wallis, se consideró trabajar durante las diferentes sesiones con la misma suspensión de ooquistes purificados y conservados en frío.

Resumen del ANOVA	
F	0,8693
Valor P	0,5024
Diferencias significativas entre medias (P<0,05)?	No
R cuadrado	0,1698

Tabla 1: ANOVA del porcentaje de ooquistes de *Cryptosporidium* no viables a lo largo de los diferentes días de realización de los ensayos.

Los resultados obtenidos de la viabilidad de los ooquistes a lo largo del tiempo están en línea con la información publicada en la bibliografía. Su supervivencia puede prolongarse hasta 176 días en agua potable o agua fluvial con una inactivación final de 89-99% de la población, sin embargo, la supervivencia de estas formas infectantes depende mucho de la temperatura a la que se encuentran, siendo sensibles a temperaturas extremas. En un estudio realizado con ratones (Rose & Slifko, 1999) se demostró que el parásito mantiene su viabilidad a temperaturas de refrigeración (5°C) durante 7 días, pero a temperaturas de congelación inferiores a -15°C los ooquistes dejan de ser viables en 1 día. Sin embargo, éstos no sobreviven a temperaturas extremas, ya que se comprobó que los ooquistes mantenidos a 59,7°C durante 5 minutos infectaron solo a 1 de 6 ratones, mientras que ningún ratón se infectó con ooquistes sometidos a temperaturas superiores a 67,5°C durante 5 minutos.

Por otro lado, también se sabe que el pH es un factor importante. El protozoo pierde viabilidad en ambientes con pH alcalino (pH >10) y pH ácido (pH < 4) resistiendo bastante bien a cambios dentro del rango de neutralidad (pH 6-8). Por último, cabe destacar que *Cryptosporidium* puede sobrevivir mejor en ambientes húmedos que en secos, donde a temperatura adecuada puede llegar a resistir varios meses (King & Monis, 2006).

Por tanto, de acuerdo con nuestros resultados y en línea con la bibliografía, se puede concluir que, tras la purificación de los ooquistes, estos son viables durante días en medios de tampón a temperatura de refrigeración, lo que nos permitió trabajar con alícuotas de la misma suspensión purificada en las diferentes sesiones de experimentos de inactivación.

6.2 Evaluación del tratamiento de radiación UV-C en la inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium*

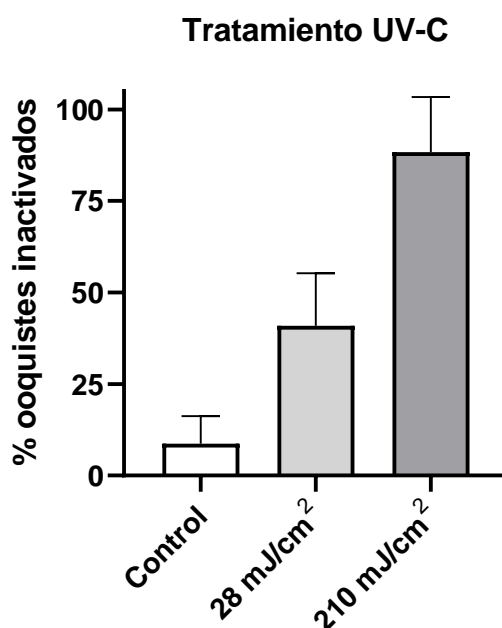


Figura 9: Porcentaje de inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium* tras diferentes tratamientos con UV-C.

La Figura 9 muestra el porcentaje de inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium* tras dos tratamientos de UV-C de diferente intensidad. Se observa la inactivación es mayor tras el tratamiento de irradiación UV-C de mayor intensidad (210 mJ/cm²) frente al de menor intensidad (28 mJ/cm²). El tratamiento más moderado consiguió inactivar aproximadamente un 40 % de los ooquistes, mientras que, tras el tratamiento más intenso, la inactivación aumentó hasta el 80 %. Los grupos de datos seguían una distribución normal según los test de *Anderson-Darling*, *Shapiro-Wilk* y *Kolmogorov-Smirnov* (valores $p < 0.05$). La **Tabla 2** muestra los resultados del ANOVA que resultaría de analizar los tres grupos de datos. Se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de ooquistes inactivados en las muestras control frente a las tratadas.

Resumen del ANOVA	
F	106,0
Valor P	<0,0001
Diferencias significativas entre medias (P<0,05)?	Si
R cuadrado	0,8249

Tabla 2: ANOVA del porcentaje de ooquistes de *Cryptosporidium* inactivados tras dos tratamientos de UV-C de diferente intensidad.

Por tanto, los tratamientos de UV-C en las condiciones estudiadas inactivaron cierto porcentaje de ooquistes de *Cryptosporidium*, aunque no el 100 %, por lo que en términos de salud pública no sería suficiente para garantizar la potabilidad del agua de bebida.

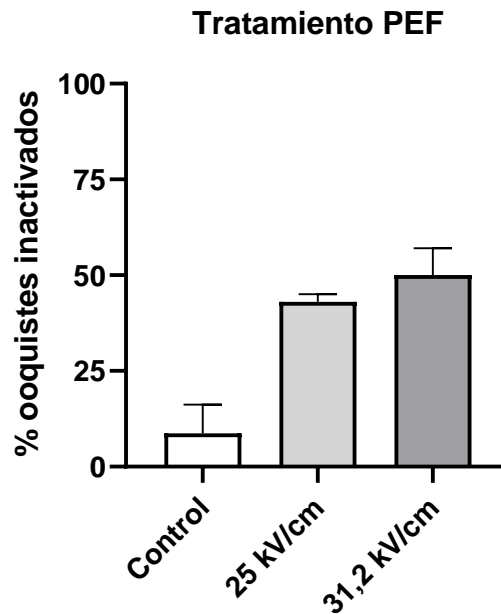
En un estudio similar realizado por Adeyemo et al. (2019), se comprobó que la dosis de 230 mJ/ cm² reduce la capacidad de desenquistamiento de los ooquistes de *C. parvum* en un 99%. No obstante, los resultados de distintos estudios pueden variar en función de las diferencias de las condiciones experimentales, como la calidad del agua y su temperatura, el tipo de lámpara UV utilizada o incluso la cepa del parásito.

En relación con la eficacia de este tratamiento frente a otros parásitos, para reducir la viabilidad de los huevos de *Ascaris spp* y *Taenia spp* en una unidad logarítmica se necesitan dosis de UV de 80 mJ/ cm² (Hazell et al., 2019). Además, en un estudio realizado por Fernández-Boo et al. (2021) se comprobó que para inactivar por completo otros microorganismos como *Bonamia ostreae* y *Perkinsus olseni* se requiere una dosis superior a 450 mJ/ cm²; sin embargo, el 85% de las células de *P. olseni* se inactivaron en 21 días de cultivo tras una exposición a 94 mJ/ cm², lo que indica que *Cryptosporidium* es más resistente.

En términos generales resulta mucho más complicado inactivar las formas infectantes de los parásitos en comparación con los virus. Se conoce que el virus más resistente a los tratamientos con UV es el adenovirus, siendo necesarios 125 mJ/ cm² para inactivar 3 unidades logarítmicas, lo que equivaldría a un 99,9% de inactivación (Hignen & Medema, 2005). Asimismo, se ha demostrado que para las concentraciones típicas de SARS-CoV-2 en ambientes cerrados de bajo nivel de contaminación y en el esputo de pacientes con COVID-19, una dosis de radiación UV-C de tan solo 4 mJ/cm² es suficiente para inactivar totalmente el virus (Biasin et al., 2021).

Por tanto, el uso de la tecnología de irradiación UV-C para la inactivación efectiva de ooquistes de *Cryptosporidium* requeriría de instalaciones y equipos capaces de aplicar mayores dosis o de su combinación con otras técnicas de desinfección como podrían ser métodos físicos o el uso de desinfectantes como el cloro.

6.3 Evaluación de la intensidad del tratamiento de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje en la inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium*



*Figura 10: Porcentaje de inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium* tras diferentes tratamientos de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje.*

La Figura 10 muestra el porcentaje de inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium* tras dos tratamientos de PEF de diferente intensidad del campo eléctrico. El tratamiento de 25 kV/cm produjo la inactivación de aproximadamente el 45 % de los ooquistes, mientras que el tratamiento más intenso (31,2 kV/cm) produjo la inactivación de aproximadamente el 50 %. **La Tabla 3** muestra el resumen del ANOVA unidireccional que comparó los tres grupos de datos y el test posterior de Tukey's de comparaciones múltiples.

Resumen del ANOVA	
F	54,72
Valor P	<0,0001
Diferencias significativas entre medias (P<0,05)?	Si
R cuadrado	0,8201

Test de Tukey's de comparaciones múltiples	Diferencia de medias,	95,00%IC de la dif.,	Significativo?	Valor ajustado	P
Control vs. 25 kV/cm	-34,26	-45,31 to -23,21	Si	<0,0001	
Control vs. 31,2 kV/cm	-41,26	-54,52 to -28,00	Si	<0,0001	
25 kV/cm vs. 31,2 kV/cm	-7,000	-23,39 to 9,387	No	0,5433	

*Tabla 3: ANOVA del porcentaje de inactivación de ooquistes de *Cryptosporidios* tras dos tratamientos de PEF de diferente intensidad y test de Turkey's de comparaciones múltiples.*

Como se ha comentado previamente, el tratamiento PEF actúa produciendo un fenómeno llamado electroporación, que consiste en aumentar la permeabilidad de la membrana citoplasmática al paso de iones y macromoléculas. Sin embargo, según la intensidad del campo eléctrico, los poros formados durante el tratamiento pueden volver a cerrarse o por el contrario volverse permanentes, siendo este último el efecto deseado (permeabilización irreversible). Dicha intensidad del campo eléctrico necesaria para provocar la irreversibilidad de los poros está inversamente relacionada con el tamaño de la célula.

En consecuencia, la intensidad del campo eléctrico necesaria para inducir la electroporación en células microbianas (bacterias, levaduras; 1 a 10 μm) es mayor (>10 kV/cm) que la necesaria para las células vegetales eucariotas (40 a 200 μm ; <5 kV/cm). Martínez et al. (2020) compararon la intensidad del campo eléctrico y la energía específica total requerida para electroporar un cierto porcentaje de diferentes tipos de células, mostrando la asociación entre esos parámetros y el diámetro de la célula. Sin embargo, esto es una simplificación matemática para una sola célula esférica. Para afectar la viabilidad de los parásitos, los poros formados en la membrana celular durante el tratamiento deben persistir en ausencia del campo eléctrico (electroporación irreversible). Una vez que la membrana finalmente se rompe, el contenido intracelular se escapa con la consiguiente pérdida de actividades metabólicas celulares.

El impacto letal del PEF dependerá de diferentes factores, como la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento, así como del propio microorganismo, la temperatura de tratamiento y las características del medio. Aumentar la intensidad del tratamiento, ya sea mediante un incremento en la intensidad del campo eléctrico o el tiempo de tratamiento, aumenta la irreversibilidad de los poros, ya que cuanto mayor sea el tamaño del poro creado, más tardará en cerrarse una vez que el campo ha cesado. No obstante, este incremento en la magnitud del tratamiento también afecta la cantidad de energía requerida y la temperatura del medio durante el proceso.

Cryptosporidium es un organismo eucariota y sus ooquistes son de forma esférica y miden entre 4,2 y 5,4 μm de diámetro. Aparte de las diferencias en cuanto al tipo celular y las capas extra, el tamaño y forma de estos parásitos son bastante similares a los de las levaduras, sobre las que se han publicado un gran número de estudios (Martínez et al., 2020). Sin embargo, las diferentes estructuras del ooquiste dificultan que la célula y el medio extracelular se comporten como un condensador, es decir, que cumplan con las propiedades que los harían sensibles a la electroporación. Además, las paredes de los ooquistes son muy resistentes a las perturbaciones mecánicas y casi herméticas a los agentes químicos de inactivación, en

particular ácidos fuertes, detergentes y desinfectantes clorados por lo que es esperable que su inactivación con PEF sea difícil.

Haas y Aturalie (1999) trataron ooquistes de *C.parvum* en tampón 0.1 PBS mediante pulsos de onda cuadrada (anchura de pulsos entre 1–99 μ s), 20 pulsos de entre 1–3 kV aplicados en cubetas de 0.8 mL, lo que supone una energía de 22–87 kJ/kg. Estos autores evaluaron la inactivación mediante una técnica de desenquistamiento. En los tratamientos combinados con peróxido de hidrógeno (10 mg/L) se observó una tasa de supervivencia del 27% de los ooquistes, cifra que se incrementó al 30% en tratamientos combinados con permanganato de potasio (4 mg/L).

En línea con estos autores, nuestros resultados muestran que tras el tratamiento PEF aplicado a temperatura ambiente se obtuvieron inactivaciones por debajo del 50% de los ooquistes. Incluso aplicando campos eléctricos elevados (>30 kV/cm) el tratamiento por sí solo no sería suficiente para evitar la transmisión del parásito en agua.

6.4 Evaluación de la temperatura de aplicación del tratamiento de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje en la inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium*

Un estudio realizado por Yan et al. (2021) demostró que la combinación de PEF y altas temperaturas mejoran la inactivación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias *Escherichia coli* y *Bacilo venezensis* que la suma de los efectos provocados por los tratamientos por separado. Al aplicar ambos tratamientos conjuntamente, aumentó el grado de electroporación irreversible, así como la tasa de inactivación de los microorganismos.

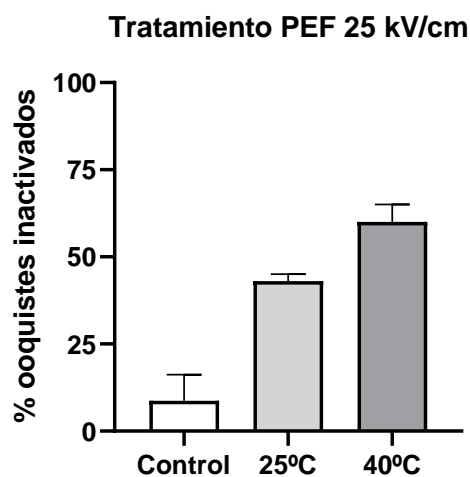


Figura 11: Porcentaje de inactivación de oocistos de *Cryptosporidium* tras aplicar el tratamiento de PEF a diferentes temperaturas.

La Figura 11 muestra el porcentaje de inactivación de oocistos de *Cryptosporidium* tras dos tratamientos de PEF aplicados a diferentes temperaturas (25 y 40°C). La tabla 4 muestra el correspondiente análisis estadístico ANOVA unidireccional y el post-test de comparaciones múltiples.

Resumen del ANOVA	
F	91,26
Valor P	<0,0001
Diferencias significativas entre medias (P<0,05)?	Si
R cuadrado	0,8795

Test de Tukey's comparaciones múltiples	Diferencia de medias	95,00%IC de la dif,	Significativo ?	Valor ajustado	P
Control vs. 25°C	-34,26	-45,06 to 23,46	Si	<0,0001	
Control vs. 40°C	-51,26	-62,06 to 40,46	Si	<0,0001	
25°C vs. 40°C	-17,00	-31,32 to 2,676	Si	0,0178	

Tabla 4: ANOVA del porcentaje de inactivación de oocistos de *Cryptosporidium* tras aplicar el tratamiento de PEF a diferentes temperaturas.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los ooquistes sin tratar y tratados y también en función de la temperatura de aplicación del tratamiento. El aumento de la temperatura de aplicación de los 25 a los 40°C aumentó la inactivación desde el 45% al 62% por lo que se observa una correlación entre el incremento de temperatura y la inactivación del parásito, sin embargo, se necesitarían hacer más estudios a diferentes temperaturas para conseguir mejores resultados.

6.5 Evaluación de la combinación del tratamiento de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje y la radiación UV-C en la inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium*

Otros investigadores han evaluado el empleo secuencial de luz UV y pulsos eléctricos en zumo de manzana fresco, llegando a la conclusión de que, desde el punto de vista de la inactivación microbiana, la combinación de ambos tratamientos da mejores resultados que la tecnología PEF sola, pudiendo provocar una inactivación casi completa de los microorganismos (levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas) y evitando los efectos negativos en la calidad del producto que producen los tratamientos térmicos convencionales (Cramariuc et al., 2011), conclusión que puede extrapolarse a nuestro estudio.

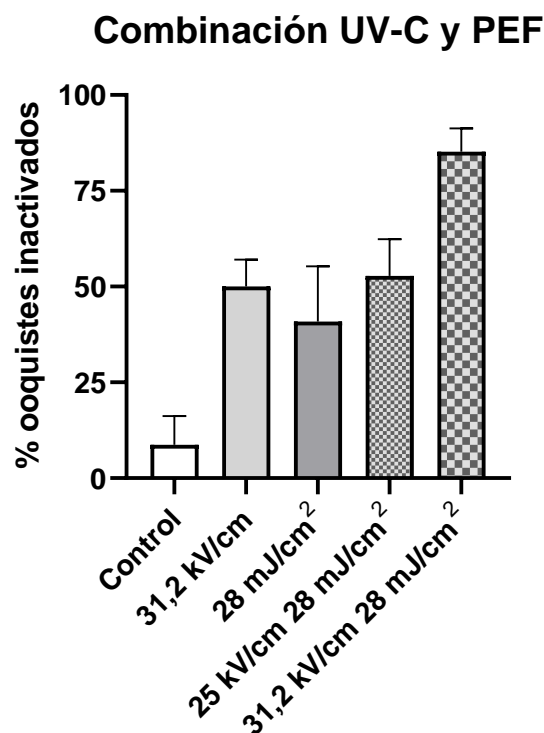


Figura 12: Porcentaje de inactivación de ooquistes de cryptosporidios tras combinar el tratamiento de irradiación UV-C con el tratamiento de PEF.

Test de Tukey's de comparaciones múltiples	Diferencia de medias,	Significativo?	Valor P ajustado
Control vs. 31,2 kV/cm	-41,26	Si	<0,0001
Control vs. 28 mJ/cm ²	-32,14	Si	<0,0001
Control vs. 25 kV/cm 28 mJ/cm ²	-44,04	Si	<0,0001
Control vs. 31,2 kV/cm 28 mJ/cm ²	-76,43	Si	<0,0001
31,2 kV/cm vs. 28 mJ/cm ²	9,125	No	0,7658
31,2 kV/cm vs. 25 kV/cm 28 mJ/cm ²	-2,780	No	0,9989
31,2 kV/cm vs. 31,2 kV/cm 28 mJ/cm ²	-35,17	Si	0,0006
28 mJ/cm ² vs. 25 kV/cm 28 mJ/cm ²	-11,91	No	0,5467
28 mJ/cm ² vs. 31,2 kV/cm 28 mJ/cm ²	-44,29	Si	<0,0001
25 kV/cm 28 mJ/cm ² vs. 31,2 kV/cm 28 mJ/cm ²	-32,39	Si	0,0017

Tabla 5: Post-test de comparaciones múltiples de los porcentajes de inactivación de los ooquistes de *Cryptosporidium* tras aplicar el tratamiento de irradiación UV-C y el tratamiento PEF. Se han incluido los tratamientos PEF y UV-C a objeto de poder comparar y detectar las posibles sinergias.

Según nuestros resultados, se observan diferencias estadísticamente significativas al combinar la irradiación UV-C con el tratamiento de PEF más intenso (31,2 kV/cm) respecto a la aplicación única de los PEF a la misma intensidad.

Aun cuando de forma ideal el efecto buscado al combinar ambos tratamientos sería sinérgico, en el estudio realizado ha sido sumatorio, al igual que ocurrió en un estudio realizado previo que combinaba PEF y UV-C para inactivar *E. coli* en zumo de manzana (Gachovska et al., 2008). Es decir, la combinación de ambos tratamientos es similar al efecto de la suma de uno más otro, no se multiplica el efecto por el hecho de aplicar simultáneamente ambos. Esto podría deberse a que ambos tratamientos tienen un mecanismo de acción diferente. Mientras que los PEF actúan creando poros en la membrana celular, aumentando su permeabilidad, la luz UV daña el ADN impidiendo la replicación del microorganismo afectado.

Por otro lado, no se observan diferencias estadísticamente significativas cuando la irradiación UV-C se combina con el tratamiento PEF más moderado (25 kV/cm) en comparación a la aplicación única de la irradiación UV-C.

Finalmente, con este trabajo se observa que la mejor manera de inactivar la mayor cantidad de ooquistes de *Cryptosporidium* es la combinación de la irradiación UV-C con el tratamiento PEF más intenso. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados previamente mencionados, podemos considerar que se conseguiría un mayor porcentaje de inactivación si estos dos métodos se combinaran con temperaturas mayores de 40°C.

7. CONCLUSIONES

1. Los ooquistes de *Cryptosporidium spp.* conservan su viabilidad tras ser mantenidos en refrigeración y medio tampón durante un periodo de al menos 5 días.
2. Tanto los tratamientos UV-C como los PEF inactivan un porcentaje de los ooquistes de este parásito, que dependiendo de las condiciones estudiadas oscila entre 40% y 80%, lo cual revela la extraordinaria resistencia de este protozoo.
3. La combinación de ambos tratamientos incrementa significativamente el porcentaje de inactivación, aunque en ningún caso alcanza el 100% en las condiciones estudiadas, por lo que su uso no asegura la potabilidad del agua de bebida.
4. Los tratamientos con PEF son más eficaces al combinarse con altas temperaturas (40°C) y con UV-C en comparación con su uso por separado.
5. Los hallazgos del presente trabajo revelan que los tratamientos evaluados pueden ofrecer resultados muy prometedores en la desinfección del agua, aunque se necesitan nuevas investigaciones para incrementar el porcentaje de inactivación, bien optimizando las condiciones de aplicación o mediante su uso combinado con otras tecnologías como la cloración.

8. CONCLUSIONS

1. *Cryptosporidium spp.* oocysts remain viable after being refrigerated and kept in a buffer medium for at least 5 days.
2. Both UV-C and PEF treatments inactivate a portion of the oocysts of this parasite, with effectiveness ranging from 40% to 80% depending on the conditions, highlighting the exceptional resilience of this protozoan.
3. Combining both treatments significantly increases the inactivation rate, but it never reaches 100% under the studied conditions, thus failing to ensure the potability of drinking water.
4. PEF treatments are more effective when combined with high temperatures (40°C) and UV-C than when used alone.
5. The findings of this study indicate that the evaluated treatments show great promise for water disinfection, though additional research is necessary to enhance the inactivation rate, either by optimizing the treatment conditions or by combining them with other technologies such as chlorination.

9. VALORACIÓN PERSONAL

La realización del presente Trabajo de Fin de Grado me ha resultado muy valiosa para mi desarrollo tanto académico como profesional ya que no solo me ha permitido mejorar mi capacidad para encontrar información científica fiable y redactar lo más destacado con un lenguaje técnico, sino que también he podido aprender los conceptos básicos que se trabajan en un laboratorio, así como familiarizarme con un instrumental que hasta ahora no conocía más que de forma teórica.

Por otro lado, este proyecto me ha permitido reflexionar sobre la importancia de desarrollar nuevas técnicas a incorporar en el tratamiento tanto de agua de bebida como de agua recreativa para disminuir la carga de *Cryptosporidium*, ya que este parásito puede tener consecuencias perniciosas para la salud pública.

Finalmente, me gustaría agradecer a mis tutores Juan Manuel Martínez y Joaquín Quilez por su acompañamiento desde el primer día, por su paciencia en el laboratorio y, sobre todo, por sus sabias correcciones.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, V., Alejandre, M., Hernández-Fernández, E., Raso, J., Cebrián, G., & Álvarez-Lanzarote, I. (2023). Evaluation of Pulsed Electric Fields (PEF) Parameters in the Inactivation of *Anisakis* Larvae in Saline Solution and Hake Meat. *Foods*, 12(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/foods12020264>
- Adeyemo, F. E., Singh, G., Reddy, P., Bux, F., & Stenström, T. A. (2019). Efficiency of chlorine and UV in the inactivation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater. *PLOS ONE*, 14(5), e0216040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216040>
- Augendre, L., Costa, D., Escotte-Binet, S., Aubert, D., Villena, I., Dumètre, A., & La Carbona, S. (2023). Surrogates of foodborne and waterborne protozoan parasites: A review. *Food and Waterborne Parasitology*, 33, e00212. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2023.e00212>
- Ayuntamiento Tarazona (s.f.). *La potabilizadora de Tarazona cuenta con un equipo de desinfección de luz ultravioleta para asegurar la calidad del agua* <https://www.tarazona.es/tarazona-actualidad/noticias/la-potabilizadora-de-tarazona-cuenta-con-un-equipo-de-desinfeccion-de>

- Bacchetti, R., Connelly, L., Browning, L., & Alexander, C. L. (2023). Changing Molecular Profiles of Human Cryptosporidiosis Cases in Scotland as a Result of the Coronavirus Disease, COVID-19 Pandemic. *British Journal of Biomedical Science*, 80, 11462. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11462>
- Barba, F. J., Parniakov, O., Pereira, S. A., Wiktor, A., Grimi, N., Boussetta, N., Saraiva, J. A., Raso, J., Martin-Belloso, O., Witrowa-Rajchert, D., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2015). Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Research International*, 77, 773-798. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.015>
- Biasin, M., Bianco, A., Pareschi, G., Cavalleri, A., Cavatorta, C., Fenizia, C., Galli, P., Lessio, L., Lualdi, M., Tombetti, E., Ambrosi, A., Redaelli, E. M. A., Saule, I., Trabattoni, D., Zanutta, A., & Clerici, M. (2021). UV-C irradiation is highly effective in inactivating SARS-CoV-2 replication. *Scientific Reports*, 11(1), 6260. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85425-w>
- Bouزيد, M., Kintz, E., & Hunter, P. R. (2018). Risk factors for *Cryptosporidium* infection in low and middle income countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(6), e0006553. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006553>
- Bukhari, Z., Glen, W. G., & Clancy, J. L. (1999). Effects of pH on a fluorogenic vital dyes assay (4',6'-diamidino-2-phenyl-indole and propidium iodide) for *Cryptosporidium* sp. oocysts. *Water Research*, 33(13), 3037-3039. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00013-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00013-5)
- Carter, B. L., Chalmers, R. M., & Davies, A. P. (2020). Health sequelae of human cryptosporidiosis in industrialised countries: A systematic review. *Parasites & Vectors*, 13(1), 443. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04308-7>
- CDC - DPDx—*Cryptosporidiosis*. (2024, junio 3). <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>
- Costa, D., Razakandrainibe, R., Valot, S., Vannier, M., Sautour, M., Basmaciyan, L., Gargala, G., Viller, V., Lemeteil, D., Ballet, J.-J., French National Network on Surveillance of Human Cryptosporidiosis, Dalle, F., & Favennec, L. (2020). Epidemiology of Cryptosporidiosis in

France from 2017 to 2019. *Microorganisms*, 8(9), Article 9.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091358>

Cramariuc, R., Popa, M., Tudorache, A., Brîndușe, E., Kontek, A., Mitelut, A., Fotescu, L., Cramariuc, B., Geicu, M., & Nisiparu, L. (2011). PEF and UV combined system for pathogen microorganisms inactivation in liquid food products. *Journal of Physics: Conference Series*, 301, 012010. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/301/1/012010>

Cullinan, L., McLean, S., & Dunn, L. (2020). Preventing and controlling *Cryptosporidium* spp. in aquatic facilities: Environmental health practitioners' experiences in Victoria, Australia. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 44(3), 233-239. <https://doi.org/10.1111/1753-6405.12984>

De Felice, L., Basset, C., Unzaga, J.M. (2023). *Cyptosporidium* spp. En Unzaga, J.M y Zonta M.L (Coords.), *Protozoos parásitos de importancia sanitaria: un abordaje transdisciplinar*. (pp 103-114). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP)

*DECRETO 265/2023, de 25 de octubre, del Gobierno de Aragón, por el que se declara la situación de necesidad de acción coordinada de ámbito supramunicipal, y se toma conocimiento de las actuaciones llevadas a cabo por el Departamento de Sanidad y el Instituto Aragonés del Agua para la eliminación del protozoo *Cryptosporidium*, en las potabilizadoras de agua para consumo humano de Los Fayos, Torrellas, Tarazona y Novallas (Zaragoza)*. Boletín Oficial de Aragón, 211, de 2 de noviembre de 2023
<https://www.boa.aragon.es/cgi-bin/EBOA/BRSCGI?CMD=VEROBJ&MLKOB=1300622280707>

Delso, C., Martínez, J. M., Cebrián, G., Condón, S., Raso, J., & Álvarez, I. (2022). Microbial Inactivation by Pulsed Electric Fields. En J. Raso, V. Heinz, I. Alvarez, & S. Toepfl (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry: Fundamentals and Applications* (pp. 169-207). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-70586-2_5

Doménech, E., Martorell, S., Kombo-Mpindou, G. O. M., Macián-Cervera, J., & Escuder-Bueno, I. (2022). Risk assessment of *Cryptosporidium* intake in drinking water treatment plant by a

combination of predictive models and event-tree and fault-tree techniques. *Science of The Total Environment*, 838, 156500. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156500>

EFSA Panel on Biological Hazards, BIOHAZ. (22 de Abril de 2024)). Re-evaluation of certain aspects of the EFSA Scientific Opinion of April 2010 on risk assessment of parasites in fishery products, based on new scientific data. Part 1: ToRs1–3. *EFSA Journal*, 22(4), e8719.

Enas, A. E., Hadel, M. A., Emad, A. A., Ibrahim, B. E., Morsy, S., & Noha, M. A. (2023). Post-COVID-19 cryptosporidiosis: A serious risk or mere association? *Tropical Biomedicine*, 40(2), 199-207. <https://doi.org/10.47665/tb.40.2.012>

European Centre for Disease Prevention and Control, Solna, Sweden. (22-27 de 10 de 2023). Weekly Communicable Disease Threats Report, week 39, Week 43. Obtenido de <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/communicable-disease-threats-report-week-43-2023.pdf>

Fernández-Boo, S., Provot, C., Lecadet, C., Stavarakakis, C., Papin, M., Chollet, B., Auvray, J.-F., Arzul, I., Lecadet, C., Stavarakakis, C., Papin, M., Chollet, B., Auvray, J.-F., & Arzul, I. (2021). Inactivation of marine bivalve parasites using UV-C irradiation: Examples of *Perkinsus olseni* and *Bonamia ostreae*. *Aquaculture Reports*, 21. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100859>

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), 2200038. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.35.2200038>

Gachovska, T. K., Kumar, S., Thippareddi, H., Subbiah, J., & Williams, F. (2008). Ultraviolet and Pulsed Electric Field Treatments Have Additive Effect on Inactivation of *E. coli* in apple Juice. *Journal of Food Science*, 73(9). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00956.x>

- García-Gil, Á., Abeledo-Lameiro, M. J., Gómez-Couso, H., & Marugán, J. (2020). Kinetic modeling of the synergistic thermal and spectral actions on the inactivation of *Cryptosporidium parvum* in water by sunlight. *Water Research*, 185, 116226. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116226>
- García-R, J. C., & Hayman, D. T. S. (s. f.). A review and analysis of cryptosporidiosis outbreaks in New Zealand. *Parasitology*, 150(7), 606-611. <https://doi.org/10.1017/S0031182023000288>
- Gayán et al. (2014). Biological aspects in food preservation by ultraviolet light: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1-20.
- Gerace, E., Lo Presti, V. D. M., & Biondo, C. (2019). *Cryptosporidium* Infection: Epidemiology, Pathogenesis, and Differential Diagnosis. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 9(4), 119-123. <https://doi.org/10.1556/1886.2019.00019>
- Gharpure, R., Perez, A., Miller, A. D., Wikswa, M. E., Silver, R., & Hlavsa, M. C. (2019). Cryptosporidiosis outbreaks—United States, 2009–2017. *American Journal of Transplantation*, 19(9), 2650-2654. <https://doi.org/10.1111/ajt.15557>
- Golomazou, E., Mamedova, S., Eslahi, A. V., & Karanis, P. (2024). *Cryptosporidium* and agriculture: A review. *Science of The Total Environment*, 916, 170057. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170057>
- Haas, C. N., & Aturaliye, D. (1999). Semi-quantitative characterization of electroporation-assisted disinfection processes for inactivation of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 899-905. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00725.x>
- Hazell, L., Braun, L., & Templeton, M. R. (2019). Ultraviolet sensitivity of WASH (water, sanitation, and hygiene)-related helminths: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(9), e0007777. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007777>

- King, B. J., & Monis, P. T. (2007). Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology*, 134(Pt 3), 309-323. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001491>
- Kotnik, T., Kramar, P., Pucihar, G., Miklavcic, D., & Tarek, M. (2012). Cell membrane electroporation-Part 1: The phenomenon. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 28, 14-23. <https://doi.org/10.1109/MEI.2012.6268438>
- Kowalski. (2009). *Ultraviolet germicidal irradiation handbook. UVGI for air and surface disinfection*. New York: Springer.
- Kristanti, R. A., Hadibarata, T., Syafrudin, M., Yilmaz, M., & Abdullah, S. (2022). Microbiological Contaminants in Drinking Water: Current Status and Challenges. *Water, Air, & Soil Pollution*, 233(8), 299. <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05698-3>
- Martínez, J. M., Abad, V., Quílez, J., Reina, D., Pérez-Martin, J. E., Raso, J., Cebrián, G., & Álvarez-Lanzarote, I. (2024). Inactivation of *Trichinella* spp. In naturally infected boar meat after Pulsed Electric Field (PEF) treatments. *Food Control*, 163, 110482. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110482>
- Martínez, J. M., Abad, V., Quílez, J., Raso, J., Cebrián, G., & Álvarez-Lanzarote, I. (2023). Pulsed Electric Fields (PEF) applications in the inactivation of parasites in food. *Trends in Food Science & Technology*, 138, 470-479. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.030>
- Ministerio de Sanidad. (29 de julio de 2022). Informe Nacional de Calidad Sanitaria de las Piscinas. Obtenido de https://www.sanidad.gob.es/en/profesionales/saludPublica/saludAmbLaboral/calidadAgua/piscinas/pdf/Informe_Piscinas_2021.pdf
- Ministerio de Sanidad- Dirección General de Salud Pública. (2023). Incremento de casos y brotes de criptosporidiosis en España 2023.
- Moreira, N. A., & Bondelind, M. (2017). Safe drinking water and waterborne outbreaks. *Journal of Water and Health*, 15(1), 83-96. <https://doi.org/10.2166/wh.2016.103>

- NTM/ EFE. (03 de octubre de 2023). Hallan el origen del brote de gastroenteritis de Tarazona en el río Queiles, en Soria. Deia.
- Ortiz et al. (08 de agosto de 2020). *Toxoplasma gondii* oocysts, *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in outdoor swimming pools in Brazil. Obtenido de 10.1111/zph.12757
- Pane, S., & Putignani, L. (2022). *Cryptosporidium*: Still Open Scenarios. *Pathogens*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050515>
- Reh, L., Muadica, A. S., Köster, P. C., Balasegaram, S., Verlander, N. Q., Chércoles, E. R., & Carmena, D. (2019). Substantial prevalence of enteroparasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. In asymptomatic schoolchildren in Madrid, Spain, November 2017 to June 2018. *Eurosurveillance*, 24(43), 1900241. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.43.1900241>
- Rochelle, P. A., Upton, S. J., Montelone, B. A., & Woods, K. (2005). The response of *Cryptosporidium parvum* to UV light. *Trends in Parasitology*, 21(2), 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.11.009>
- Rose, J. B., & Slifko, T. R. (1999). *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and Their Impact on Foods: A Review. *Journal of Food Protection*, 62(9), 1059-1070. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.9.1059>
- Smolarz, B., Wilczyński, J., & Nowakowska, D. (2014). DNA repair mechanisms and *Toxoplasma gondii* infection. *Archives of Microbiology*, 196(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0944-0>
- Vanathy, K., Parija, S. C., Mandal, J., Hamide, A., & Krishnamurthy, S. (2017). Cryptosporidiosis: A mini review. *Tropical Parasitology*, 7(2), 72-80. https://doi.org/10.4103/tp.TP_25_17
- Watier-Grillot, S., Costa, D., Petit, C., Razakandrainibe, R., Larréché, S., Tong, C., Demont, G., Biletorte, D., Mouly, D., Fontan, D., Velut, G., Corre, A. L., Beauvir, J.-C., Mérens, A., Favennec, L., & Santi, V. P. de. (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>

Wood, M., Simmonds, L., MacAdam, J., Hassard, F., Jarvis, P., & Chalmers, R. M. (2019). Role of filtration in managing the risk from *Cryptosporidium* in commercial swimming pools—A review. Journal of Water and Health, 17(3), 357-370. <https://doi.org/10.2166/wh.2019.270>

Yan, Z., Yin, L., Hao, C., Liu, K., & Qiu, J. (2021). Synergistic effect of pulsed electric fields and temperature on the inactivation of microorganisms. AMB Express, 11(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01206-8>

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>