



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



**“PRESENCIA DE PARÁSITOS EN FRESAS  
EXPENDIDAS EN MERCADOS DE MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO”**

TESIS

PRESENTA:

**HERIBERTO SÁNCHEZ GARCÍA**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

ASESOR: Q.F.B GUADALUPE ERÉNDIRA OROZCO MOSQUEDA

COASESOR: DRA. NELLY RAQUEL GONZÁLEZ ARENAS

**MORELIA, MICHOACÁN, OCTUBRE DE 2022**

## ÍNDICE

Dedicatoria	4
Agradecimientos	5
Aceptación de Protocolo de Investigación	6
1. Resumen	7
2. Marco Teórico	9
2.1 Generalidades de las parasitosis	
2.1.2 Blastocistosis	12
2.1.2.1 Morfología de <i>Blastocystis spp</i>	
2.1.2.2 Ciclo de Vida de <i>Blastocystis spp</i>	
2.1.2.3 Cuadro Clínico de las Blastocistosis	
2.1.2.4 Diagnóstico de Laboratorio	
2.1.3 Amibiasis	15
2.1.3.1 Morfología de <i>Entamoeba histolytica</i>	
2.1.3.2 Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	
2.1.3.3 Cuadro Clínico de Amibiasis	
2.1.3.4 Diagnóstico de Laboratorio de <i>Entamoeba</i>	
2.1.4 Giardiasis	19
2.1.4.1 Morfología de <i>Giardia</i>	
2.1.4.2 Ciclo de vida de <i>Giardia</i>	
2.1.4.3 Cuadro Clínico de Giardiasis	
2.1.4.4 Diagnóstico de Laboratorio	
2.1.5 Ciclosporiasis	23
2.1.5.1 Morfología de <i>Cyclospora</i>	
2.1.5.2 Ciclo de Vida de <i>Cyclospora</i>	
2.1.5.3 Cuadro Clínico de Ciclosporiasis	
2.1.5.4 Diagnóstico de Laboratorio	
2.1.6 Criptosporidiosis	26
2.1.6.1 Morfología de <i>Cryptosporidium</i>	

2.1.6.2 Ciclo de Vida de <i>Cryptosporidium</i>	
2.1.6.3 Cuadro Clínico de Criptosporidiosis	
2.1.6.4 Diagnóstico de Laboratorio	
2.1.7 Ascariasis	29
2.1.7.1 Morfología de <i>Ascaris</i>	
2.1.7.2 Ciclo de Vida de <i>Ascaris</i>	
2.1.7.3 Cuadro Clínico de Ascariasis	
2.1.7.4 Diagnóstico de Laboratorio	
2.1.8 Estrongiloidosis	33
2.1.8.1 Morfología de <i>Strongyloides</i>	
2.1.8.2 Ciclo de Vida de <i>Strongyloides</i>	
2.1.8.3 Cuadro Clínico de Estrongiloidosis	
2.1.8.4 Diagnóstico de Laboratorio	
2.2 Normatividad de Alimentos y agua en México	37
2.3 Generalidades de la fresa	40
2.4 Uso de desinfectantes en frutas y hortalizas	41
3. Planteamiento del Problema	45
4. Justificación	46
5. Hipótesis de trabajo	52
6. Objetivos	52
6.1 Objetivo General	
6.2 Objetivos Específicos	
7. Métodos y Materiales	52
8. Resultados	59
9. Discusión	67
10. Conclusiones	70
11. Recomendaciones	71
12. Referencias Bibliográficas	72
13. Anexos	80

## DEDICATORIA

A mi hermosa Familia y personas especiales que me han acompañado en este trayecto, que siempre han querido ver mis sueños realizados. Y en especial para mis abuelitos Raúl, María y Juan que ahora son estrellas que yacen en el firmamento.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mis maestros de la Facultad, que me dieron las herramientas necesarias para poder desempeñar un buen papel en mi vida profesional.

A las Químicas y Químicos del Laboratorio de Microbiología y Parasitología del Hospital Infantil que me enseñaron lo que es el trabajo, el compromiso con los pacientes y además siempre estuvieron presentes en el proceso de la realización de este proyecto, Químicas Ceci, Kary, Nena, Arge, Lolita, Lupita, Ivonne y Almita. A los químicos Víctor, Juan Carlos y Carlos.

A mis compañeros y amigos que hice durante el servicio social.

A mis amigos de la Facultad, en especial a Suly.

A mí querida y estimada Química Ere, que es gracias a ella que se llevó a cabo este proyecto en el que sin duda he aprendido muchas cosas diferentes y muy enriquecedoras para la vida profesional. Gracias por el tiempo, las enseñanzas, las pláticas. Siempre tendrá un espacio muy grande en mi corazón.

A mi co-asesora en Ciudad de México Dra. Nelly, por el tiempo, la entrega con el proyecto y el conocimiento adquirido respecto a la biología molecular.

A mi familia en Ciudad de México, mis tíos Rosita y Eduardo, mis primos Lau, Ángel y la pequeña Sofí, que me abrieron las puertas de su casa para mi estadía y me apoyaron en todo lo que necesité.

A toda mi familia, mi abuelita Carmen, tíos y primos. Que siempre me apoyaron en las decisiones que he tomado, el amor y cariño que me han demostrado.

A mis tíos Chilo y Mario, que los considero como mis padres. Gracias por el apoyo, las palabras de aliento, el amor y cariño que siempre me demuestran y que es correspondido.

Y, por último, pero no por ello menos importantes a mis padres Heriberto y Laura, mi hermana Dany. Estoy infinitamente agradecido por todo lo que me han dado a lo largo de mi vida. Enseñanzas, pláticas, conocimiento, amor, cariño, valores que me han convertido en un ser humano integro. Los amo con todas las fuerzas de mi ser y siempre están y estarán presentes en cada paso que dé o cada decisión tomada.

## ACEPTACIÓN DE PROTOCOLO.



Secretaría  
de Salud  
GOBIERNO DE MICHOACÁN

### HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA "EVA SAMANO DE LÓPEZ MATEOS" JEFATURA DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION

Morelia Michoacán, 01 de octubre 2021

Asunto: Aprobación de protocolo de investigación

Q.F.B GUADALUPE ERENDIRA OROZCO MOSQUEDA  
PRESENTE

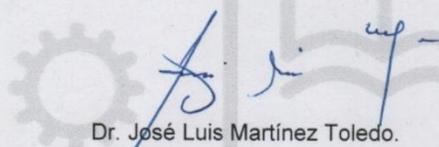
Me permito informar a usted que su protocolo de investigación titulado: **"PRESENCIA DE PARÁSITOS EN FRESAS, EXPENDIDAS EN MERCADOS DE MORELIA, MICHOACAN. MEXICO"**, ha sido aprobado por el Comité de Ética en Investigación de este hospital con **número de registro: HIM/LMP/07/2021**.

Dicho protocolo permitirá al Pasante en Químico Farmacobiología Heriberto Sánchez García, obtener el título de Químico Farmacobiólogo, por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Le recordamos que deberá enviar a este Comité, informe de avance e informe final de acuerdo al desarrollo del cronograma de esta investigación.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente.



Dr. José Luis Martínez Toledo.  
Presidente del Comité de Ética en Investigación

Cp. Archivo Comité de Ética en Investigación.



Gobierno de  
Michoacán  
HONESTIDAD Y TRABAJO

## 1. RESUMEN

**Antecedentes:** Los parásitos son causa de enfermedades y muerte en el mundo, se propagan en lugares con nivel socioeconómico bajo e inadecuadas medidas de saneamiento, cultura médica, además de una pobre infraestructura. Un mecanismo de transmisión de parásitos es mediante alimentos contaminados; en México, cada año se enferman 16 mil personas por esta causa.

**Objetivo:** Evaluar la presencia de parásitos en fresas expandidas en mercados de Morelia, Michoacán. México

**Material y métodos:** Se analizaron 135 fresas procedentes de tres diferentes expendios: mercados municipales, mercados ambulantes y super mercados. Cada fresa se colocó en bolsa de plástico nueva, trasladándolas al Laboratorio de Microbiología y Parasitología del Hospital Infantil de Morelia, dividiéndolas y sometiendo una parte al lavado con solución salina isotónica y otra con Tween al 20%; realizando examen directo en fresco, técnica de concentración de Ritchie y de Sheather a ambos lavados. Se efectuó un segundo muestreo, adquiriendo las fresas en los establecimientos anteriores, tomando como unidad de análisis 15 fresas, transportándolas de la misma manera; sometiénolas al lavado con solución salina isotónica y procesando éste por las técnicas utilizadas en el primer muestreo. Se incluyó el medio de cultivo de Jones, para el crecimiento de *Blastocystis spp.* Las muestras positivas microscópicamente a *Blastocystis spp.* y el 10% de negativas para ambos muestreos se llevaron al Hospital “Dr. Manuel Gea González”, sometiénose a Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

**Resultados:** De 135 fresas, 61 (45.18%) tenían parásitos, siendo las del tianguis Municipal las mayormente contaminadas. Las tres especies de parásitos encontrados fueron *Blastocystis spp.*, *Entamoeba coli* y *Endolimax nana*, además de Amebas y/o Flagelados de vida libre. El parásito de mayor frecuencia fue *Blastocystis spp.* En la PCR, no se logró amplificar el ADN del parásito *Blastocystis spp.* En el segundo muestreo el análisis total fue de 9 muestras, teniendo como unidad de medida 15 fresas, resultando, 44.4% con parásitos. El parásito identificado fue *Blastocystis spp.* y amebas y/o flagelados de vida libre. En la detección por PCR, no se amplificó el ADN de *Blastocystis spp.* Obteniéndose resultados negativos en el medio de Cultivo de Jones.

**Conclusiones:** Las fresas expandidas en los mercados de Morelia se hallan contaminadas con *Blastocystis spp.*, *Entamoeba coli* y *Endolimax nana*, así como amebas y/o flagelados de vida libre. Se lograron resultados negativos para la PCR y el medio de cultivo de Jones.

**Palabras clave:** *Blastocystis spp.*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, PCR, Solución Salina Isotónica, Tween al 20%.

## ABSTRACT

**Background:** Parasites are a cause of disease and death in the world, they spread in places with low socioeconomic status and inadequate sanitation measures, medical culture, in addition to poor infrastructure. One of the transmission mechanisms of parasites is through contaminated food; In México, every year 16 thousand people get sick from this cause.

**Objective:** To evaluate the presence of parasites in strawberries sold in markets in Morelia, Michoacán. México.

**Material and methods:** 135 strawberries from three different outlets were analyzed: municipal markets, street markets and super markets. Each strawberry was placed in a new plastic bag, transferring to the Microbiology and Parasitology Laboratory of the Morelia Children's Hospital, dividing them and subjecting one part to washing with Isotonic Saline Solution and the other with 20% Tween; performing direct examination in fresh, Ritchie and Sheather concentration technique in both washes. A second sampling was carried out, acquiring the strawberries in the previous establishment, taking 15 strawberries as the unit of analysis, transporting them in the same way; subjecting them to washing with Isotonic Saline Solution and processed by the techniques used in the first sampling. Jones culture medium was included for the growth of *Blastocystis spp.* Microscopically positive samples to *Blastocystis spp.* and 10% of the negative for both samples were taken "Dr. Manuel Gea González" Hospital, undergoing Polymerase Chain Reaction (PCR).

**Results:** Of 135 strawberries, 61 (45.18%) had parasites, being those of the municipal market the most contaminated. The three species of parasites found were *Blastocystis spp*, *Entamoeba coli* and *Endolimax nana*. In addition to free-living Amebas and/or Flagellates. The most frequent parasite was *Blastocystis spp*. In the PCR detection, it was not possible to amplify the DNA of the parasite *Blastocystis spp*. For the second sampling a total of 9 samples were analyzed, taking into account that the unit of measurement was 15 strawberries, obtaining that 44.4% had parasites. The parasite found was *Blastocystis spp*, as well as free-living Amebas and/or Flagellates. In the PCR detection, it was not possible to amplify the DNA of *Blastocystis spp*. And negative results were obtained in the Jones Culture medium.

**Conclusions:** the strawberries sold in the markets of Morelia are contaminated with parasites such as *Blastocystis spp*, *Entamoeba coli* and *Endolimax nana*. In addition to Amoebas and/or free-living Flagellates. Negative results were achieved for PCR and Jones culture medium.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 GENERALIDADES DE LAS PARASITOSIS

Un parásito es un organismo que vive sobre un organismo hospedero o en su interior y se alimenta a expensas del mismo. La parasitología se inicia con el hallazgo de los parásitos por el hombre, hecho que tiene su origen desde tiempos muy remotos y en donde diferentes civilizaciones comienzan a describir las infecciones parasitarias. El hombre, es hospedero de cientos de especies de parásitos animales, entre otros microorganismos. Se sabe que las enfermedades parasitarias han producido a través de los tiempos más muertes que todas las guerras juntas, y esto tiene relación debido a los mecanismos de diseminación que han ido desarrollando estos. Todo esto en parte favorecido por las condiciones climáticas ya sean cálidas o templadas, además se han observado incrementos de parasitosis en países en vías de desarrollo y con un mínimo de cultura sanitaria y práctica médica. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente 3500 millones de personas se encuentran parasitadas y, de estas, 450 millones manifiestan la enfermedad ocasionada por estos organismos. Los grupos de edad más afectados por las enfermedades parasitarias, sobre todo de las transmitidas por fecalismo, contagio o por el suelo, son los niños<sup>1</sup>.

Cuando un agente extraño: ya sea virus, bacteria o parásito, invade el organismo, el sistema inmunitario lo identifica y reacciona en su contra con el único propósito de eliminarlo. Los parásitos son organismos complejos capaces de infectar al ser humano; igual que todos los agentes infecciosos, inducen una respuesta inmunitaria en el hospedero que invaden. Aunque el objetivo final de la respuesta inmunitaria sea la de eliminar el patógeno, muchas veces la inmunidad no puede hacerlo y entonces se genera una Inmunopatología, conocidas como hipersensibilidad<sup>2</sup>.

Las respuestas del hospedero a la invasión por un parásito proceden de la siguiente secuencia:

- Reacción de fase aguda

- Activación de los Linfocitos T colaboradores o cooperadores (Th) precursores
- Reactivación de los linfocitos Th activados
- Activación de los linfocitos Th de tipo 1 o de tipo 2 (Th1 o Th2)
- Respuesta inmune mediada por células o por anticuerpos
- Resolución de la infección, cronicidad o muerte del hospedero<sup>3</sup>.

Durante la infección parasitaria se pueden activar todos los distintos efectores del sistema inmune. Sin embargo, no todos los sistemas efectores son igualmente eficaces contra los distintos parásitos. En términos generales, la respuesta celular, o Th1, es eficaz contra parásitos intracelulares y la respuesta humoral, o Th2, es eficaz contra parásitos extracelulares. En el caso de helmintos, dado su tamaño y complejidad estructural, solo la respuesta celular mediada por anticuerpos (Th2) suele ser eficaz. No obstante, esta eficacia de la respuesta celular mediada por anticuerpos suele estar restringida a formas juveniles o inmaduras<sup>3</sup>.

Hablando específicamente de los helmintos, estos tienen la característica de inducir niveles elevados de anticuerpos de isotipo IgE, así como eosinofilia (aumento en el número de eosinófilos sanguíneos) y mastocitosis (incremento en el número de células cebadas). Estas respuestas dependen, en gran parte, de las citocinas que produce el subtipo de linfocitos Th2, como la IL-5. Las respuestas IgE inducidas por helmintos son, en general, resultado de activación policlonal de células B, y sólo una pequeña fracción de la IgE total reconoce a antígenos del parásito. Se sabe que esta eosinofilia es mediada, sobre todo, por la IL-5, ya que atrae gran cantidad de eosinófilos al lugar donde se encuentra el parásito<sup>4</sup>.

En México, donde gran parte de la población vive en pequeños poblados con menos de 400 personas, actualmente es imposible pensar en que existan condiciones que impidan la transmisión de las enfermedades parasitarias (drenaje, agua potable, saneamiento ambiental, etc.) y si además consideramos que la gente vive en hacinamiento practicando el fecalismo al ras del suelo, y conviviendo con animales de todo tipo, son condiciones que favorecen aún más la prevalencia de las parasitosis<sup>5</sup>.

La vía de transmisión más frecuente es la fecal-oral o digestiva, en la cual se ingieren las formas parasitarias. Los parásitos pueden estar presente de esta manera ya sea por fuentes de contaminación directa como frutas y verduras, esto ocurre porque en algunos países, el riego de sembradíos se hace con aguas negras, por lo que las formas infectantes pueden quedarse alojadas en algunos productos que se cultivan a ras del suelo, como las legumbres, que al llegar al consumidor son un mecanismo de transmisión de parásitos intestinales, si es que éstas no son tratadas y lavadas adecuadamente<sup>5</sup>.

Se estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas — casi 1 de cada 10 habitantes— por ingerir alimentos contaminados y que 420 000 mueren por esta misma causa. Los niños menores de 5 años soportan un 40% de la carga atribuible a las enfermedades de transmisión alimentaria, que provocan cada año 125 000 defunciones en este grupo de edad<sup>6</sup>.

Todos los alimentos que forman parte de la pirámide alimenticia pueden potencialmente ser el vehículo de transmisión de parásitos a la especie humana, desde el agua, las frutas y las verduras, los productos cárnicos y piscícolas, así como sus derivados, hasta todo tipo de producto almacenado, cuyo proceso de conservación no impida la viabilidad de las formas infectantes para la especie humana. Enfermedades como la amebiasis representan en el mundo 500 millones de infectados, con 40 a 50 millones de enfermos y entre 40 y 100.000 decesos anuales motivados por esta etiología. La ascariasis motiva 785 a 1.150 millones de portadores, con 200 a 214 millones de casos clínicos y 20 a 60.000 muertes por año<sup>7</sup>.

Los parásitos denominados protozoarios, se clasifican en 4 tipos: rizópodos, flagelados, ciliados y esporozoos. Los parásitos helmintos que afectan al ser humano son: nematelmintos, que comprenden a los nemátodos (gusanos redondos) y platelmintos, que incluyen a los cestodos (gusanos planos) y tremátodos<sup>5</sup>.

Los parásitos más frecuentemente encontrados en humanos son *Blastocystis* y *Giardia lamblia*, sin embargo, en la temporada de lluvias hay un aumento de casos

de las coccidias *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* y *Cystoisospora belli*<sup>5</sup>.

Algunas de las especies de parásitos aisladas de aguas contaminadas son *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Balantidium coli*, *Cryptosporidium spp.*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli* y helmintos, incluyendo a los llamados geohelmintos (helmintos que requieren pasar un tiempo en la tierra para madurar y ser infectantes)<sup>5</sup>, tales como *Áscaris lumbricoides*, *Trichuris*, *Ancylostoma*, *Strongyloides*, entre otros<sup>8</sup>.

De entre los parásitos más frecuentes en nuestro medio, que además pueden diseminarse a través de agua y alimentos contaminados, podemos incluir a *Blastocystis spp*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides*, *Cyclospora Cayetanensis* y *Cryptosporidium spp*<sup>5,8,9</sup>.

### **2.1.2 BLASTOCISTOSIS**

*Blastocystis* es un parásito protista genéticamente diverso de potencial patógeno poco claro que coloniza los intestinos de los humanos y una amplia gama de animales. El hallazgo de este parásito en heces de diversas especies animales sugiere su potencial zoonótico. Las tasas de infección pueden superar el 20% en países en vías de desarrollo<sup>10</sup>.

Las primeras descripciones fueron realizadas por Alexeieff y Brumpt en 1912, este parásito había sido considerado un hongo imperfecto, una levadura y un protista intracelular, actualmente está clasificado dentro del Reino *Stramenophila*<sup>10</sup>. Recientemente, *Blastocystis* se clasificó en 28 subtipos (ST) sobre la base del gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña (SSUrDNA), designadas de la siguiente manera: ST1-ST17, ST21, ST23-ST29 Y ST30-ST32, de los cuales ST1-ST8, ST10, ST12, ST14 y ST16 se encuentran tanto en humanos como en animales,

ST9 hasta ahora se ha identificado sólo en humanos y las ST restantes se han encontrado sólo en animales<sup>11</sup>.

### 2.1.2.1 MORFOLOGÍA DE *BLASTOCYSTIS*

*Blastocystis spp.* se encuentra recubierto por una cápsula de espesor variable con funciones de adherencia y nutrición celular. El número de núcleos es variable, las formas parasitarias pequeñas poseen uno o dos núcleos localizados en los extremos opuestos de la célula, mientras que las células más grandes pueden presentar hasta 4 núcleos. Presenta 6 formas parasitarias variables en tamaño, estructura y lugar de ocurrencia. Las 4 formas principales son la vacuolar, la granular, la ameboide y la quística. Y las 2 formas menos frecuentes: multivacuolar y avacuolar<sup>10</sup> (Figura 1).

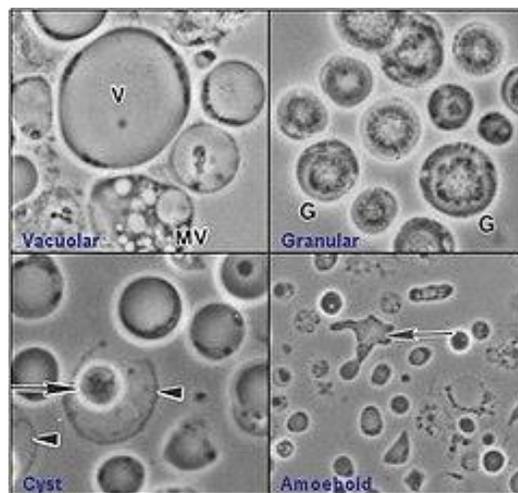
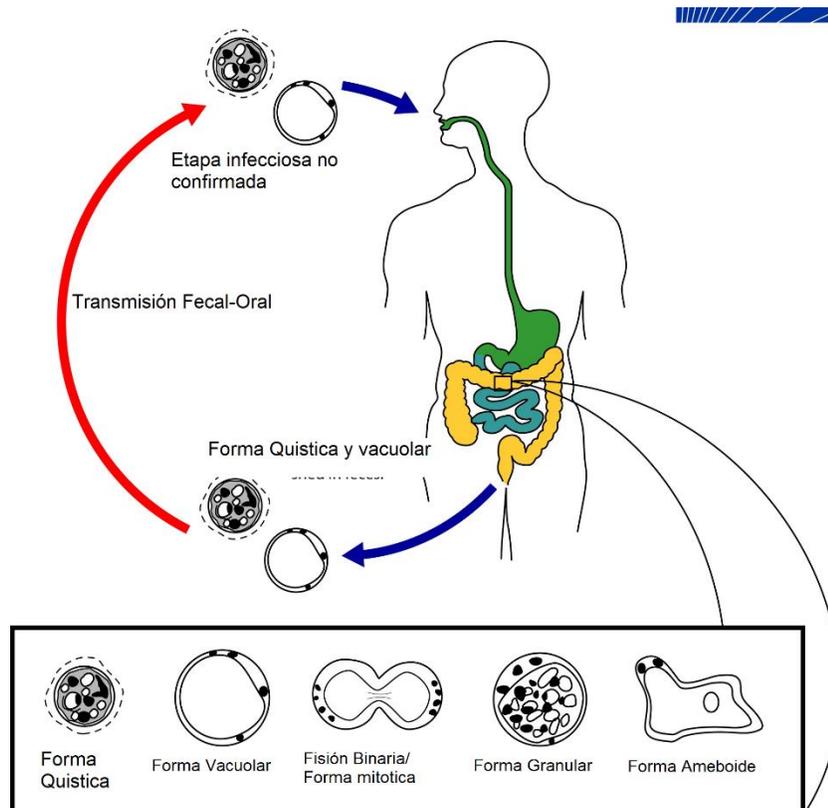


Figura 1. Morfología de *Blastocystis spp.* Tomado de:  
[https://www.researchgate.net/publication/23316914\\_New\\_Insights\\_on\\_Classification\\_Identification\\_and\\_Clinical\\_Relevance\\_of\\_Blastocystis\\_spp/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/23316914_New_Insights_on_Classification_Identification_and_Clinical_Relevance_of_Blastocystis_spp/figures?lo=1)

### 2.1.2.2 CICLO DE VIDA DE *BLASTOCYSTIS*

El ciclo de vida de *Blastocystis* aún no se conoce bien. La reproducción más frecuente observada en el hospedero es por bipartición, la forma de ameba puede reproducirse por plasmotomía que consiste en extensiones circulares de la célula que se separan de la célula madre con uno o más núcleos, pero también fuera del cuerpo central. La esquizogonia ocurre en el cuerpo central formando gran cantidad de progeñe (esquizonte) hasta que la célula se rompe liberando a los organismos<sup>5</sup> (Figura 2).



Diversas formas que ocasionalmente pueden verse en muestras de heces humanas y en cultivo. Su significado biológico no se comprende bien

Figura 2: Ciclo de Vida de *Blastocystis* spp. Tomado de: <https://www.cdc.gov/parasites/blastocys>

### 2.1.2.3 CUADRO CLÍNICO DE BLASTOCYSTIS

*Blastocystis spp* ha sido detectado en las heces de individuos asintomáticos y sintomáticos con prevalencias similares. La infección se ha asociado a signos y síntomas como diarrea, estreñimiento, dolor abdominal, náuseas, anorexia, vómitos, fatiga, flatulencia, distensión abdominal, proctosigmoiditis hemorrágica, urticaria crónica, artritis infecciosa y prurito palmo plantar<sup>10</sup>.

### 2.1.2.4 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

*Blastocystis spp* puede ser observado en muestras de materia fecal frescas, aunque el método de elección son los frotis y la tinción permanente. Los preparados microscópicos pueden ser visualizados en forma directa, con lugol, o bien teñidos con Giemsa o coloración tricrómica<sup>2</sup>. En contraste, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha demostrado ser una herramienta rápida y altamente sensible para la identificación del parásito y la detección de variantes genéticas. Los métodos disponibles para la identificación de *Blastocystis spp*. incluyen la amplificación por PCR del gen SSUrRNA combinada con secuenciación para la identificación de los subtipos<sup>10</sup>.

### 2.1.3 AMIBIASIS

La amibiasis es una infección humana producida por el protozooario *Entamoeba histolytica* y afecta sobre todo el intestino grueso, si bien puede dañar otras regiones del cuerpo. El protozooario se denomina ameba, pero se ha extendido el uso menos riguroso de amiba y por consiguiente a la enfermedad se le conoce como amibiasis. Desde el punto de vista patogénico los agentes se llaman en realidad *E. histolytica*, cuando es patógeno, y *E. dispar* si no lo es<sup>2</sup>.

*E. histolytica* se observa prácticamente en todos los países del mundo, pero sin lugar a dudas, la mayor incidencia de la infección se encuentra en países con clima cálido o templado y húmedo, así como condiciones socioeconómicas deficientes en donde la sanidad ambiental y alimentación son inadecuadas<sup>5</sup>.

### **2.1.3.1 MORFOLOGÍA DE ENTAMOEBA**

*Entamoeba histolytica* presenta tres estadios morfológicos sucesivos: el trofozoíto (forma móvil o vegetativa, el prequiste y el quiste, estos dos últimos inmóviles).

En el trofozoíto se distinguen dos capas: el ectoplasma, que es hialino y se encuentra en estado de “gel”, y el endoplasma, que está en fase “sol” y contiene organelos del parásito. El movimiento de este se debe a que en su ectoplasma se encuentra proteínas de actina y miosina, las cuales se contraen en el extremo contrario a la dirección de desplazamiento. En esta fase, que le permite desplazarse debido a que su citoplasma se proyecta en dirección de su movimiento y se le denomina pseudópodo. Tiene un solo núcleo que posee un cariosoma central y cromatina periférica fina y regular<sup>2</sup> (Figura 3).

El prequiste se produce cuando las condiciones del medio ambiente en que se mueve el trofozoíto son poco favorables para su vida, este empieza a inmovilizarse, elimina todo el material intracitoplasmático que no ha digerido, se redondea, se reviste de una doble membrana gruesa y refringente, la cual le confiere resistencia al parásito cuando se expone a las condiciones de medio externo al ser expulsado con la materia fecal, en este momento el prequiste solo presenta un núcleo<sup>5</sup>.

En la formación del quiste (la forma infectante del parásito), el núcleo se divide en dos y luego cuatro, quedando al final de la maduración con cuatro núcleos pequeños con características morfológicas iguales a la del trofozoíto, se recubre de una pared quística resistente y mide de 5 a 20 micras. Durante la maduración aparece el glucógeno y las barras cromatoidales (en forma de salchicha) se hacen poco visibles o desaparecen<sup>5</sup> (Figura 3).

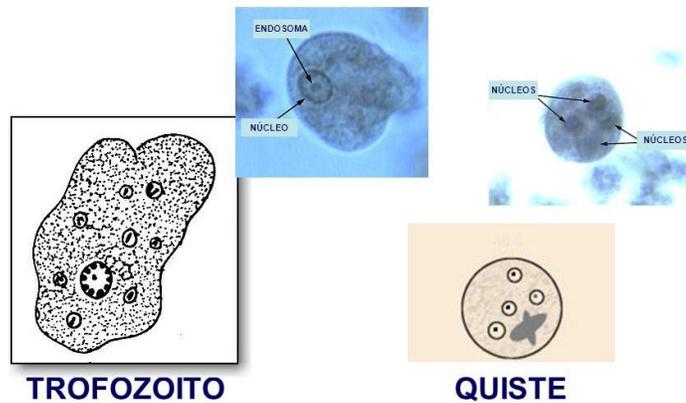


Figura 3. Morfología de *Entamoeba histolytica*. Tomado de: <https://slideplayer.es/slide/4362497/>

### 2.1.3.2 CICLO DE VIDA DE *ENTAMOEBA*

La infección por *E. histolytica* inicia cuando una persona ingiere alimentos contaminados con materia fecal que contiene quistes maduros, los cuales son resistentes a cambios ambientales. Los quistes llegan al estómago, en donde son capaces de tolerar los jugos gástricos; las enzimas hidrolíticas destruyen la pared del quiste sin afectar el citoplasma y llegan hasta íleon, en donde ocurre el desenquistamiento. De cada quiste emergen dos trofozoítos uninucleados denominados metaquísticos, se dividen y se adhieren a la mucosa intestinal, donde pueden vivir como comensales. Cuando las condiciones son desfavorables, los trofozoítos se desprenden de la mucosa e inician el enquistamiento en la luz del intestino grueso. El quiste maduro se elimina con las heces y puede ser ingerido por otro individuo, lo que completa el ciclo biológico y de transmisión de *E. histolytica*<sup>2</sup> (Figura 4)

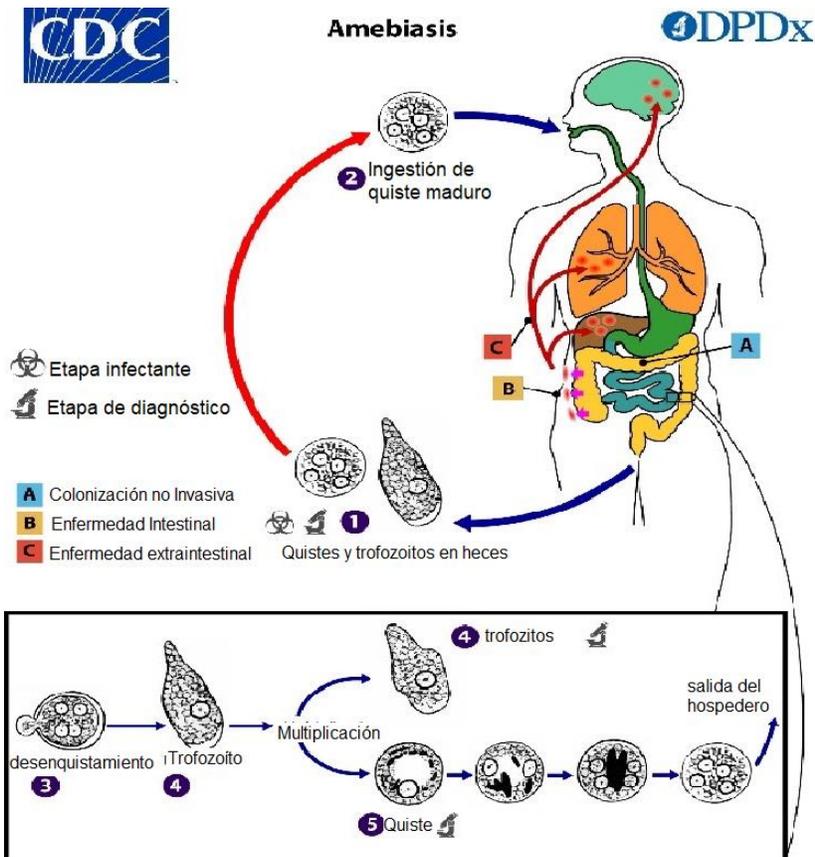


Figura 4. Ciclo de vida *Entamoeba*.  
Tomada de:  
[https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/modules/Amebiasis\\_LifeCycle\\_lq.jpg](https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/modules/Amebiasis_LifeCycle_lq.jpg)

**2.1.3.3 CUADRO CLÍNICO DE LA AMIBIASIS**

La amibiasis puede ser sintomática y asintomática. Para el primer caso cabe afirmar que la persona está infectada por *Entamoeba dispar* y el segundo caso por *Entamoeba histolytica*. Los parásitos pueden establecerse sólo en el intestino grueso, pero las cepas más patógenas son capaces de invadir otros órganos a través de vasos sanguíneos, lo cual significa que la amibiasis sintomática puede

ser intestinal y extraintestinal<sup>7</sup>. Para el caso de la amibiasis intestinal llegan a presentarse las siguientes condiciones: colitis no disentérica crónica, disentería o megacolon tóxico, ameboma o granuloma amebiano, colitis fulminante con perforación, apendicitis y rectocolitis aguda. Los sitios a menudo infectados por *E. histolytica* en el intestino grueso son ciego, sigmoideo y recto quizá porque son regiones en las que hay menos tránsito intestinal<sup>2</sup>.

Para la amibiasis extraintestinal los parásitos se pueden desplazar hacia diferentes órganos, más a menudo a hígado, piel y mucosas, pulmón, riñón y cerebro. En casos de infección de ciego y colon ascendente por amibas llegan a producirse perforación hacia la cavidad peritoneal y precipitar una peritonitis<sup>2</sup>.

#### **2.1.3.4 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE *ENTAMOEBA***

En pacientes con evacuaciones blandas o diarreicas se indica examen directo en fresco y hay mayor probabilidad de encontrar trofozoítos. Los estudios coproparasitoscópicos (CPS) cualitativos de concentración, como flotación (sulfato de zinc) o sedimentación (formol-éter), se llevan a cabo en pacientes con evacuaciones de consistencia formada o semiformada y es muy posible encontrar quistes. La sensibilidad se aumenta cuando se analizan varias muestras de diferentes días: teniendo muestras hasta de tres días una sensibilidad de 97.6%<sup>2</sup>.

En caso de sospecha de amibiasis extraintestinal, por ejemplo, a nivel hepático, se lleva a cabo una prueba de serológica en la que se detectan anticuerpos mediante pruebas inmunológicas como ELISA, inmunofluorescencia indirecta o hemaglutinación indirecta<sup>2</sup>.

#### **2.1.4 GIARDIASIS**

*Giardia intestinalis* (Sinonimia: *G. lamblia*, *G. duodenalis*) es un parásito cosmopolita del Phylum *Sarcomastigophora* y Subphylum *Mastigophora*. Este fue el primer parásito microscópico demostrado en la especie humana, descubierto por Leewenhoek, cuando observaba con el microscopio una muestra de materia fecal<sup>5</sup>.

### 2.1.4.1 MORFOLOGÍA DE GIARDIA

*Giardia lamblia* tiene dos estadios durante su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste.

**Trofozoíto:** Es piriforme, mide de 9 a 20 micras de longitud por 5 a 12 de ancho, tiene una cara dorsal convexa y una ventral plana, esta última ocupada en su mayor parte por dos depresiones adyacentes que constituyen el disco suctor, el cual funciona de manera semejante al de una ventosa. Posee dos núcleos dispuestos a los lados de la línea media y cuatro pares de flagelos que salen de blefaroplastos situados a corta distancia del borde anterior<sup>2</sup> (Figura 5).

**Quiste:** Es de forma ovoide, mide entre 8 y 12 micras de longitud, 7 a 10 micras de ancho y la pared es de 0.3 a 0.5 micras de espesor. Se observan de dos a cuatro núcleos, vacuolas y cuerpos basales, axonemas, fragmentos del disco suctor y cuerpo medio; entre la pared y la membrana plasmática se identifica un espacio lacunar<sup>2</sup> (Figura 6).



Figura 5. Morfología de Trofozoíto de *Giardia lamblia*. Tomado de: <https://fundacionio.com/salud-io/enfermedades/parasitos/giardia-intestinalis/>



Figura 6. Morfología de Quiste de *Giardia lamblia*. Tomado de: <https://pixnio.com/es/ciencia/imagenes-microscopia/giardiasis-giardia-intestinalis-es/quistes-representar->

### 2.1.4.2 CICLO DE VIDA DE *GIARDIA*

Los quistes que salen con las heces del hospedero (humanos o animales) contaminan el agua y los alimentos. El mecanismo de infección es por fecalismo. La dosis mínima infectiva es de 10 quistes: la activación se lleva a cabo cuando los quistes pasan por el estómago y se exponen a pH ácido; se desenquistan en el duodeno debido al pH alcalino. El proceso es rápido y los trofozoítos se dividen asexualmente por fisión binaria longitudinal después de salir del quiste y en ocasiones antes de terminar su salida. Las sales biliares y el colesterol favorecen su crecimiento, lo que promueve la colonización de duodeno, yeyuno e incluso íleon<sup>2</sup> (Figura 7).

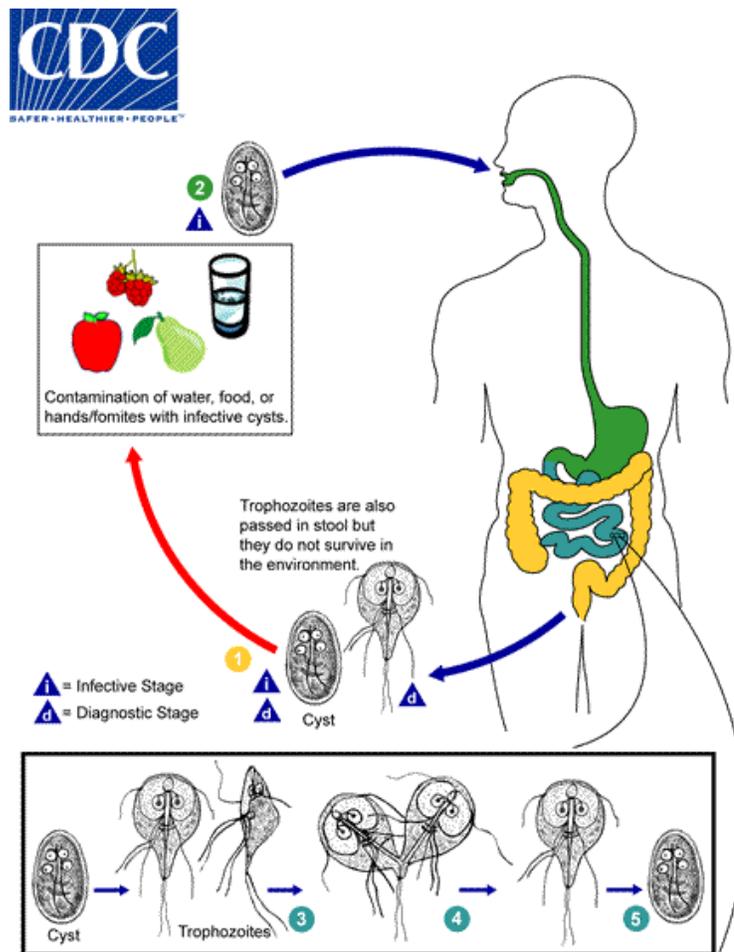


Figura 7. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. Tomado de:  
<https://www.cdc.gov/dpdx/giardia>

### **2.1.4.3 CUADRO CLÍNICO DE LAS GIARDIASIS**

La infección es más frecuente en edades pediátricas que en los adultos. Se puede presentar en lactantes, pero tiene sus picos máximos de prevalencia en los preescolares y escolares. Los reportes de trabajos hechos en México refieren que varía del 0.7% al 66%. La OMS calculó que desde 1988 hay más de 250 millones de personas infectadas<sup>5,2</sup>.

El periodo prepatente de la giardiasis es de nueve días, el de incubación de 12 a 19 días y el de infección dura algunas semanas a varios meses; esta parasitosis puede ser asintomática y sintomática con fase aguda o crónica. En la giardiasis aguda puede haber gran diversidad de signos y síntomas. En una muestra de 400 pacientes pediátricos con giardiasis pura, Álvarez-Chacón<sup>2</sup> encontró dolor abdominal, diarrea, hiporexia, meteorismo, náuseas, flatulencia, estreñimiento, vómito, peso bajo, palidez de tegumentos, borborigmos. Las evacuaciones son explosivas, profusas, acuosas al principio y después esteatorreicas, fétidas, sin sangre ni moco<sup>2</sup>.

La giardiasis crónica puede durar varios meses y es devastadora en la población infantil, porque el dolor abdominal se exagera durante la ingestión de los alimentos y los niños dejan de comer, además de que presentan meteorismo, distensión abdominal, flatulencia fétida, malestar general, astenia, adinamia, pérdida de peso, talla baja y déficit cognitivo. Las evacuaciones son blandas, esteatorreicas y fétidas. Puede alternarse con periodos de estreñimiento o evacuaciones de consistencia normal<sup>2</sup>.

### **2.1.4.4 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

En pacientes con evacuaciones blandas o diarreicas se indica examen directo en fresco y hay mayor probabilidad de encontrar trofozoítos. Los estudios coproparasitológicos (CPS) cualitativos de concentración, como flotación (sulfato de zinc) o sedimentación (formol-éter), se llevan a cabo en pacientes con evacuaciones de consistencia formada o semiformada y es muy posible encontrar

quistes. La sensibilidad se aumenta cuando se analizan varias muestras de diferentes días: teniendo muestras hasta de tres días una sensibilidad de 97.6%<sup>2</sup>.

### 2.1.5 CICLOSPOROSIS

La ciclosporiasis es una parasitosis intestinal causada por el protozoo *Cyclospora cayetanensis*, que produce en el hombre procesos diarreicos. Hasta la fecha se han descrito más de 13 especies de este género, aisladas de diferentes seres vivos. Este organismo fue observado por Scheneider en 1981 quien acuñó el género *Cyclospora glomerica*. En 1993 Ortega y col., realizaron el ciclo biológico *in vitro* de este organismo, quien propuso su clasificación taxonómica dentro del género *Cyclospora* y le dio el nombre de *C. cayetanensis*<sup>5</sup>.

#### 2.1.5.1 MORFOLOGÍA DE *CYCLOSPORA*

*Cyclospora cayetanensis* presentan dos formas. Los ooquistes inmaduros, no esporulados, presentes en materia fecal de humanos, son estructuras esféricas u ovoides, con cubierta quitinosa, no refringentes. En su interior se observan numerosos glóbulos refringentes dispuestos en forma de racimo, roseta o mórula de color verdoso. (Figura 8). Los ooquistes maduros esporulados o infectantes, contienen dos esporocistos y cada uno con 2 esporozoítos. Tanto ooquistes inmaduros como maduros están rodeados por una doble pared quitinosa, la externa es fibrilar y rugosa y tiene 63 nm de espesor y la interna es lisa y mide 50 nm de espesor<sup>5</sup> (Figura 9).



Figura 8. Ooquiste inmaduro de *Cyclospora cayetanensis*. Tomado de: [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182017000100006](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182017000100006)



Figura 9. Ooquiste maduro de *Cyclospora cayetanensis*. Tomado de: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/10/416708/reporte-de-cinco-casos-de->

### **2.1.5.2 CICLO DE VIDA DE *CYCLOSPORA***

*Cyclospora* es un parásito intracelular obligado y el ciclo completo requiere de un sólo hospedero. Los ooquistes no esporulados que se eliminan en las heces no son infectantes, es necesario que transcurran 15 días para que maduren a ooquistes esporulados. La infección se adquiere cuando se consumen alimentos sin cocción o agua de beber contaminados con ooquistes esporulados. El proceso de desenquistamiento comienza en el estómago y se completa en el intestino delgado; de cada ooquiste se liberan cuatro esporozoítos que invaden a las células epiteliales del intestino delgado. Dentro de éstas se llevan a cabo dos generaciones de esquizontes, en la primera se forman de seis a ocho merozoítos y en la segunda son cuatro merozoítos que infectan a otros enterocitos y darán lugar al ciclo de esporulación en donde se desarrollan los microgametocitos (masculino) y macrogametocitos (femenino). El primero sufre un proceso de exflagelación y surgen múltiples microgametos (semejantes a espermatozoides) que fecundan a los macrogametos, se forman los cigotos que se rodean de una pared quística y darán lugar a los ooquistes no esporulados (estadio diagnóstico, de resistencia y de dispersión). Cuando los enterocitos se rompen, se liberan los ooquistes que se eliminarán con las heces<sup>2</sup> (Figura 10).

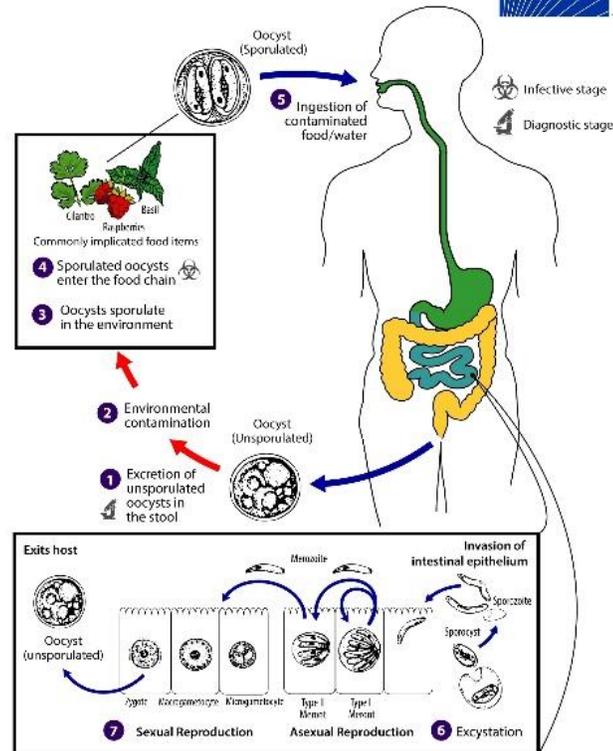


Figura 10. Ciclo de vida de *Cyclospora cayetanensis*. Tomado de: <https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/Frames/A->

### 2.1.5.3 CUADRO CLÍNICO DE CICLOSPOROSIS

Se presenta en pacientes inmunocompetentes como en pacientes inmunocomprometidos. En el paciente inmunocompetente, la sintomatología se inicia con febrícula y malestar general, uno a dos días después se presenta diarrea abrupta, acuosa, de color amarillo verdoso y presencia de moco y grasa en número de 5 a 9 evacuaciones al día, con presencia de dolor abdominal tipo cólico, meteorismo, anorexia, vómito, mialgias, astenia, adinamia, cefalea y pérdida de peso, con remisiones y exacerbaciones<sup>5</sup>.

En pacientes inmunocomprometidos, la sintomatología es similar a la encontrada en pacientes inmunocompetentes, sin embargo, el cuadro clínico no se autolimita, es más grave y tiende a la cronicidad, sobre todo en pacientes con VIH<sup>5</sup>.

#### **2.1.5.4 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE CYCLOSPORA**

El estadio diagnóstico es el ooquiste no esporulado que se elimina en la materia fecal. Para identificarlo se puede recurrir a las siguientes técnicas:

- 1) **Coproparasitoscópico:** en los coproparasitoscópicos directo en fresco o de concentración, los ooquistes se ven esféricos, no asimilan el colorante Lugol, con un material de apariencia granular que es refráctil, semejante a una mórula y poseen doble pared.
- 2) **Esporulación:** las muestras de materia fecal se homogenizan con dicromato de potasio (2.5 a 5%), se incuban a temperatura ambiente y los ooquistes con dos esporoquistes se pueden encontrar desde los 5 a los 15 días.
- 3) **Tinción:** si el diagnóstico mediante el coproparasitoscópico de concentración se dificulta, una opción es recurrir a la técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Con esta técnica los ooquistes de *Cyclospora* adquieren diferentes tonalidades, que van desde la ausencia de coloración, pasando por un rosa tenue, hasta alcanzar un color rojo intenso. Otra estrategia es la sustitución de carbolfucsina por safranina, en este caso todos los ooquistes toman un color anaranjado<sup>2</sup>.

#### **2.1.6 CRIPTOSPORIDIOSIS**

La primera descripción de *Cryptosporidium* corresponde a *C. muris*, la realizó Tyzzer en 1907, el cual encontró el parásito en las criptas gástricas de un ratón. En la actualidad se conocen varias especies de *Cryptosporidium* que pueden parasitar al hombre siendo las más comunes *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis*<sup>5</sup>.

La enfermedad es más frecuente en pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades como SIDA. En la actualidad se le considera como un parásito

oportunista o enteropatógeno de distribución mundial. Se presenta el padecimiento, sobre todo en la población infantil, como una de las causas de diarrea autolimitada, por lo que hay que descartar a este agente etiológico como causa de diarrea<sup>5</sup>.

#### **2.1.6.1 MORFOLOGÍA DE *CRYPTOSPORIDIUM***

Se presenta en el estadio de ooquiste, en materias fecales, de forma esférica u ovoide de 4 a 6 micras de diámetro. Cuando se observa a esta estructura con microscopía de contraste de fases, se le ve una doble pared y en su interior 4 esporozoítos en forma de pequeños gusanos. Con menos frecuencia se observan ooquistes en procesos de desenquistamiento<sup>5</sup> (Figura 11).

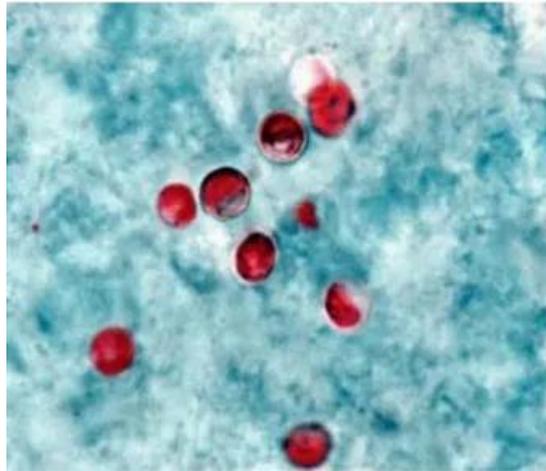


Figura 11. Ooquiste de *Cryptosporidium* spp. Tomado de: <https://1library.co/document/zqww4o2y-infeccion-por-cryptosporidium-spp-en-pediatria.html>

#### **2.1.6.2 CICLO DE VIDA DE *CRYPTOSPORIDIUM***

El ciclo de vida de *Cryptosporidium* es similar al de muchas coccidias. La forma infectante para el hombre es el ooquiste que utiliza varias vías de infección, siendo la primera por contacto directo con animales, la segunda de persona a persona y la tercera por fómites, principalmente agua y alimentos contaminados con materia fecal.

Después de la ingestión del ooquiste maduro, se liberan los esporozoítos, los cuales infectan a las células epiteliales del intestino delgado y una vez ahí se transforman en trofozoítos, sufren tres divisiones nucleares dando origen a 8 merozoítos dentro de un esquizonte de primera generación o meronte I, se liberan los merozoítos los cuales infectan otras células para formar el meronte II que contiene 4 merozoítos, que al liberarse infecta otras células; en este momento sufren diferenciación sexual formando micro y macrogametocitos. La unión de estos da origen al huevo o cigoto que posteriormente se transforma en ooquiste para completar de esta manera el ciclo biológico<sup>5</sup> (Figura 12).

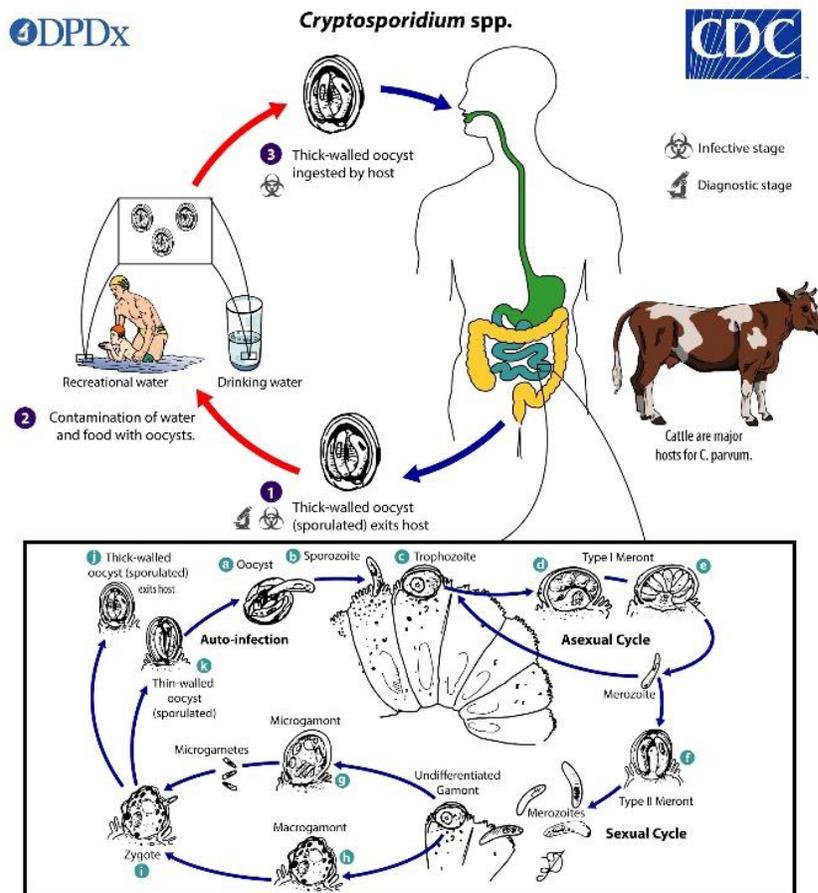


Figura 12. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. Tomada de: [https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/modules/Cryptosporidium\\_LifeCycle\\_lq.jpg](https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/modules/Cryptosporidium_LifeCycle_lq.jpg)

### **2.1.6.3 CUADRO CLÍNICO DE CRIPTOSPORIDIOSIS**

Los síntomas y signos que aparecen en un hospedero con criptosporidiosis son los de un cuadro de gastroenteritis, los cuales se incrementarán en cierto tipo de individuos con deficiencias inmunológicas y nutricionales. Se presentan evacuaciones diarreicas acuosas abundantes, que varían de 5 a 35 diarias con gran pérdida de agua, sin pérdida de sangre. En individuos inmunocomprometidos suele presentarse un síndrome de tipo coleriforme con diarrea que puede durar meses y gran pérdida de líquidos, además de náuseas, vómito, dolor abdominal, deshidratación, desequilibrio hidroelectrolítico, fiebre y adenopatías. En individuos sin compromiso inmunológico, se suele presentar un cuadro enteral con evolución de una a tres semanas, con presencia de dolor abdominal, vómito y fiebre, cuadro que cede de manera espontánea o al tratamiento<sup>5</sup>.

### **2.1.6.4 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE *CRYPTOSPORIDIUM***

El establecimiento etiológico se establece con el hallazgo de los ooquistes principalmente mediante estudios coproparasitoscópicos con técnicas de concentración tales como la de Sheather que es específica para buscar dichas formas del parásito. Como los ooquistes no se tiñen con el lugol, se debe utilizar la tinción de Ziehl-Neelsen modificada, una vez teñidos los ooquistes se podrán ver al microscopio de luz con cierta facilidad. En ocasiones se utilizan otras técnicas de tinción como el Giemsa, tricrómico de Gomorí, Kinyoun y PAS, entre otras<sup>5</sup>.

### **2.1.7 ASCARIASIS**

La ascariasis es una parasitosis que se adquiere mediante la ingestión de la forma infectante (huevo larvado), que ha madurado en el suelo, de ahí que se catalogue a esta parasitosis como una geohelmintiasis, según la OMS helmintiasis transmitidas por el suelo. El agente etiológico (*Ascaris lumbricoides*) es un nemátodo común del hombre al que le causa principalmente problemas intestinales y pulmonares; es el nemátodo más grande que parasita el tubo digestivo del hombre y seguramente fue conocido por él desde hace muchos

siglos, ya que su tamaño no pudo pasar inadvertido al ser eliminado junto con la materia fecal<sup>5</sup>.

#### **2.1.7.1 MORFOLOGÍA DE ASCARIS**

Es un gusano polimiario, alargado y cilindroide con un extremo posterior puntiagudo y anterior romo. Su cuerpo está cubierto por una capa cuticular quitinoide, estriada circularmente y dotada de cierta elasticidad. Los cordones laterales son muy aparentes y tienen el aspecto de estrías de color blanquecino que recorren longitudinalmente el cuerpo de este nemátodo. En su extremo anterior la cápsula bucal está provista de tres labios salientes, con bordes dentados y bien diferenciados. Los labios limitan la cavidad bucal pequeña y triangular, se continúa con el esófago e intestino que es tubular, termina en la cloaca en el macho y en el ano en la hembra<sup>5</sup> (Figura 13).

Se pueden observar dos tipos de huevos, los fecundados y los no fecundados. Los primeros son ovalados, de cápsula gruesa y transparente formada de tres capas. El interior presenta una masa amorfa de citoplasma, los huevos miden de 40 a 80 micras de largo por 25 a 50 de micras de ancho. Los no fecundados son depositados por las hembras que no se aparearon con los machos, son más largos y estrechos, la cubierta es muy delgada y generalmente carecen de mamelones. Para que los huevos fecundados sean infectantes para el humano, una vez expulsados junto con la materia fecal, deberán permanecer de 3 a 4 semanas en suelos cálidos y húmedos, ya que la desecación les es perjudicial y pierden su viabilidad, en este tiempo se desarrolla una larva rhabditoide de primer estadio que se transforma en larva de segundo estadio, la cual ya es infectante; bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad se acelera el desarrollo embrionario<sup>5</sup> (Figura 14).

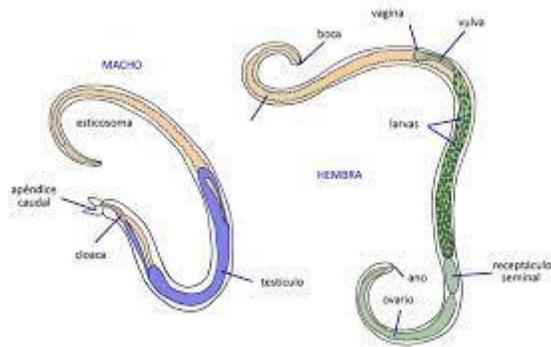


Figura 13. Larva de *Ascaris lumbricoides*. Tomada de: <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/804/820>



Figura 14. Huevos de *Ascaris lumbricoides*. Tomada de: [https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/Frames/A-F/Ascariasis/body\\_Ascariasis\\_mic1](https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/Frames/A-F/Ascariasis/body_Ascariasis_mic1)

### 2.1.7.2 CICLO DE VIDA DE ASCARIS

El mismo humano actúa como hospedero de *A. lumbricoides* para que de ahí surjan los huevos y para que regresen; es decir, se trata de un parásito monoxeno, pues requiere de un mismo hospedero para completar el ciclo biológico. El sitio de establecimiento preferencial es el intestino delgado. Macho y hembra copulan y después de varios días la hembra ovipone: los huevos caen y son arrojados hacia el exterior junto con la materia fecal durante la defecación de la persona. Los huevos no son infectivos en esos momentos; requieren de 15 a 21 días para que se larven en su interior, para ello se necesita de suelo arcilloso-arenoso, humedad y temperatura ambiental. En la tierra el huevo sufre de una transformación y se forma una larva. Ahí es donde adquiere la fase infectante para el humano. Después que el humano ingiere los huevos infectivos junto con los alimentos o mediante otros mecanismos, los huevos pasan por estómago, cuando llegan al duodeno la larva eclosiona, penetra la pared intestinal y en 24 horas llega por vía porta al hígado, donde permanece de tres a cinco días. Continúa migrando por las venas suprahepáticas, atraviesa la membrana alveolocapilar y cae en los alveolos. Se desarrolla hasta alcanzar la madurez sexual en 50 días después de la infección; luego se efectúa la fecundación entre macho y hembra que están

alojados en el intestino delgado, 10 días más tarde se pueden encontrar huevos en las heces y de nuevo comienza el ciclo de vida<sup>2</sup> (Figura 15)

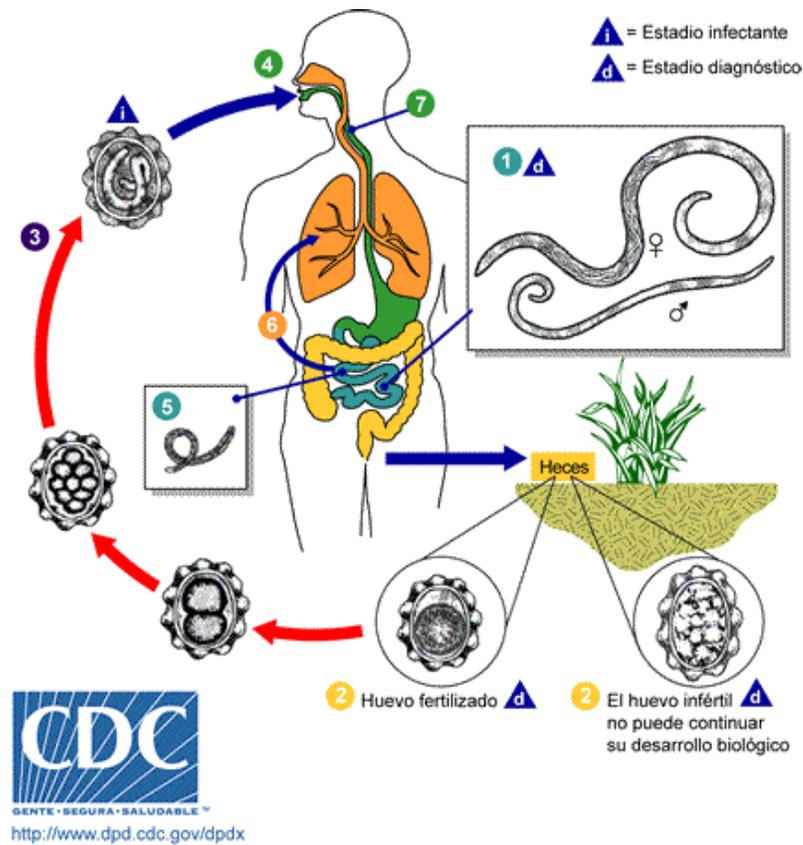


Figura 15. Ciclo de vida *Ascaris lumbricoides*. Tomada de: <https://www.cdc.gov/dpdx/ascariasis/index.html>

### 2.1.7.3 CUADRO CLÍNICO DE ASCARIASIS

*Ascaris lumbricoides* produce alteraciones anatomopatológicas, tanto en su fase de migración (larva) como en la fase de estado (adulto), presentándose también alteraciones como resultado de migraciones erráticas, tanto de larvas como de adultos. En la fase o periodo larvario, las formas larvianas atraviesan la membrana alveolocapilar y llegan al parénquima pulmonar, producen lesiones mecánicas. El consumo, por parte de los gusanos, de carbohidratos y alimentos que el paciente ingiere y la presencia de la sustancia inhibidora de la tripsina que produce *A. lumbricoides*, interfieren con la digestión y aprovechamiento de proteínas ingeridas

en la dieta por parte del hospedero, y de esta forma contribuyen a la aparición de desnutrición e impiden el desarrollo normal especialmente de los niños. En las migraciones erráticas pueden ser regurgitados y salir por la boca, escapar por las narinas, penetra ámpula de Váter, vesícula e hígado, riñón, apéndice, conducto lagrimal, conducto auditivo externo, cicatriz umbilical, etc<sup>5</sup>.

#### **2.1.7.4 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE ÁSCARIS**

El diagnóstico se hace cuando se observan los parásitos o sus productos, por ejemplo, la expulsión de gusanos por ano, boca o nariz es concluyente. Los huevos característicos en forma de corcholata se detectan mediante CPS directo o por concentración, los métodos cuantitativos son los de elección, porque correlacionan la cantidad de parásitos con la sintomatología y orientan a la terapéutica. Los estudios serológicos serán de mucho valor sobre todo en la etapa de migración larvaria para hacer diagnóstico diferencial con problemas pulmonares, siendo de gran ayuda los antígenos de excreción y secreciones o los larvales<sup>5</sup>.

#### **2.1.8 ESTRONGILOIDOSIS**

La estrongiloidosis es la parasitosis causada por especies del género *Strongyloides* que pertenecen a la superfamilia Rhabdiasoidea, familia Strongylidae, caracterizada por ser pequeña y encontrarse en el agua y en el suelo como organismos de vida libre o, como en el caso del género mencionado, con especies de interés en medicina y veterinaria. La estrongiloidosis en el humano se caracteriza por producir un cuadro de gastroenteritis de pronóstico variable, ya que puede ser una infestación leve, por lo general asintomática, o parasitosis con cuadros de enteritis o enterocolitis crónicas que, junto con fenómenos de inmunodepresión, pueden ser mortales<sup>2</sup>.

### 2.1.8.1 MORFOLOGÍA DE *STRONGYLOIDES*

Las hembras son gusanos filiformes de 2.2 mm de longitud por 20 a 74 micras de diámetro al estado parasitario, en cambio las de vida libre son más cortas, ya que solo miden 1 mm por 50 a 75 micras. El esófago está muy desarrollado y ocupa una tercera parte del cuerpo del parásito. El ano situado sobre la línea medio ventral se abre a corta distancia del extremo posterior que es puntiagudo. El útero en la hembra parásita ocupa una tercera parte de su cuerpo, en cambio la hembra de vida libre ocupa dos terceras partes. Otra característica diferencial es que, en el estado parasitario, en el útero de la hembra sólo se observan de 6 a 8 huevos (Figura 16), mientras que la hembra de vida libre se puede observar hasta 18 huevos. El macho es fusiforme y ancho, mide 0.7mm. de largo por 40-50 micras de ancho, no tiene aletas caudales, pero posee dos espículas y un gubernáculo<sup>5</sup>. (Figura 17)

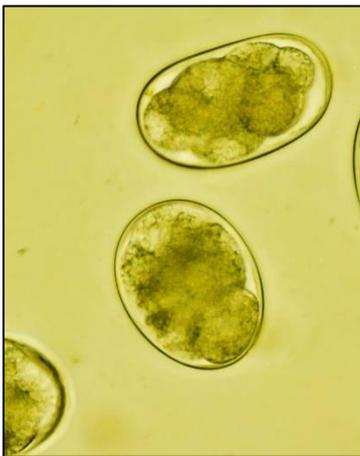


Figura 16. Huevo de *Strongyloides stercoralis*. Tomada de: <https://mejorconsalud.as.com/estrongilo-idiasis-contagia/>



Figura 17. Adulto macho de *Strongyloides stercoralis*. Tomada de: [https://reinoanimalia.fandom.com/es/wiki/Strongyloides\\_stercoralis](https://reinoanimalia.fandom.com/es/wiki/Strongyloides_stercoralis)

### 2.1.8.2 CICLO DE VIDA DE *STRONGYLOIDES*

*Strongyloides stercoralis* es un parásito facultativo, es decir, que puede hacer, tanto ciclo de vida libre (en el suelo) como ciclo de vida parásita (en el hospedero). Los huevos que son depositados por la hembra están parcialmente embrionados y quedan atrapados en el espesor de la mucosa o submucosa intestinal, al madurar

eclosionan y dan salida a una larva rabditoide que se dirige hacia la luz del tubo digestivo, es arrastrada por el bolo alimentario y sale finalmente junto con la materia fecal. En el suelo se alimenta de partículas orgánicas, sufre tres mudas, en cada una de las cuales crece hasta alcanzar finalmente el estadio adulto de vida libre. Cuando las condiciones del medio ambiente son desfavorables, las larvas rabditoides, se transforman en filariformes o infectantes para el hombre y, penetran la piel expuesta, hasta alcanzar vasos sanguíneos, de ahí son arrastrados a torrente circulatorio y pasan por diferentes sitios anatómicos hasta donde son deglutidos y pasan al tubo digestivo. La fecundación de la hembra adolescente generalmente ocurre durante su migración por tráquea o tubo digestivo, ya que la hembra penetra y se aloja en la mucosa del duodeno o yeyuno; en cambio el macho no tiene esta capacidad y es eliminado junto con la materia fecal<sup>5</sup> (Figura 18).

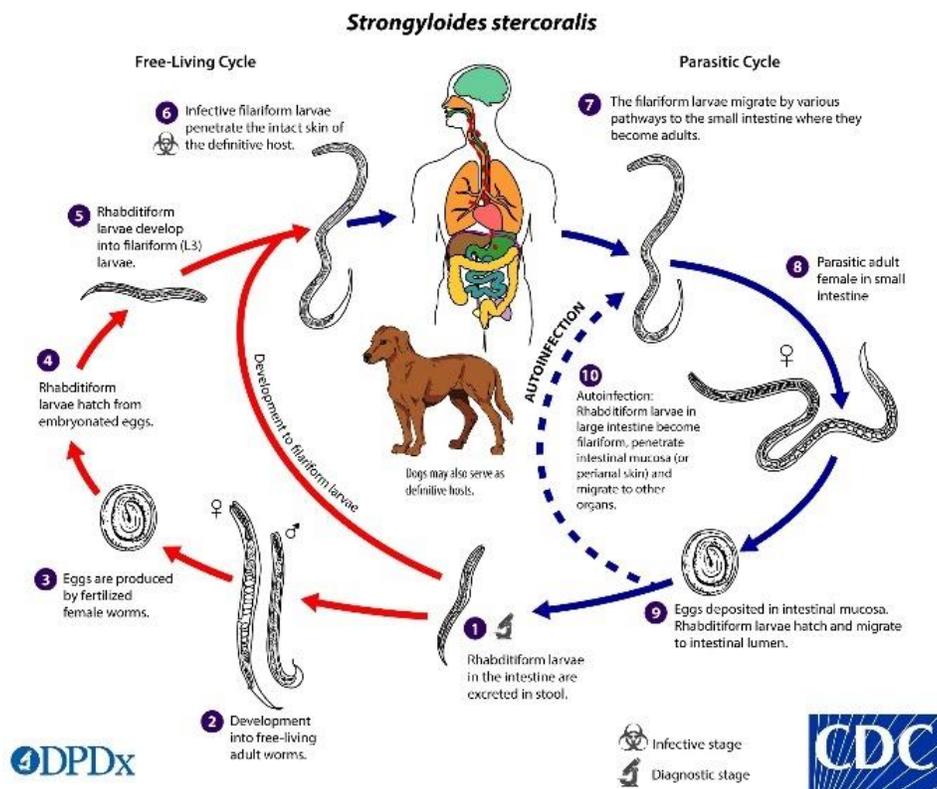


Figura 18. Ciclo de vida *Strongyloides stercoralis*. Tomada de: [https://www.cdc.gov/dpdx/strongyloidiasis/modules/Strongyloides\\_LifeCycle\\_lq.jpq](https://www.cdc.gov/dpdx/strongyloidiasis/modules/Strongyloides_LifeCycle_lq.jpq)

### **2.1.8.3 CUADRO CLÍNICO DE LA ESTRONGILOIDOSIS**

Las alteraciones anatomopatológicas son producidas, tanto en las formas larvarias como por los adultos en su hábitat final. Producen alteraciones cutáneas, en donde la penetración de forma infectante junto con bacterias, virus y hongos, va seguida de una reacción inflamatoria localizada frecuentemente en pliegues interdigitales o dorso de los pies. Así como, alteraciones pulmonares, donde el paso de las larvas desde capilares pulmonares hacia los alveolos origina ruptura de la membrana produciendo exudados de tipo bronconeumónico acompañados de fiebre y eosinofilia de corta evolución, cuadro que se conoce como síndrome de Loeffler o neumonía eosinofílica.

Las alteraciones intestinales, cuyas lesiones son originadas por la presencia de los adultos en el espesor de la mucosa intestinal, que produce una reacción inflamatoria crónica por irritación de tipo mecánico<sup>2</sup>.

### **2.1.8.4 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE *STRONGYLOIDES***

La eliminación de larvas rhabditoides a través de materia fecal se detecta mediante métodos especiales como el de Baermann; se recomienda fijar algunas de estas larvas para su identificación adecuada, ya que son semejantes a las de uncinaria, pero la bifurcación caudal del estadio filariforme nos da el diagnóstico etiológico. El cultivo de materia fecal por el método de Harada-Mori también es de utilidad, requiriéndose asimismo la identificación por fijación y observación caudal<sup>2</sup>.

## 2.2 NORMATIVIDAD DE ALIMENTOS Y AGUA EN MÉXICO

Muchos de los parásitos anteriormente descritos son adquiridos por el humano a través de la ingesta de agua o alimentos contaminados, por lo cual las autoridades gubernamentales han gestionado medidas sanitarias en la producción y venta de alimentos que promueven la protección a la población, normas legales que disminuyen el riesgo a adquirir una infección parasitaria.

Para la regulación oficial de una adecuada calidad de los alimentos, existen varias Normas Oficiales Mexicanas (NOM) que son de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en productos nacionales o de importación, las cuales se describen a continuación:

### 1.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA.

Establece el método microbiológico para determinar el número de microorganismos coliformes totales presentes en productos alimenticios por medio de la técnica de cuenta en placa. El grupo de los microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas. El uso de los coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para: La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos. La calidad sanitaria del agua y hielo utilizados en las diferentes áreas del procesamiento de alimentos. La demostración y la cuenta de microorganismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivos líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales.

El método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la

producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares<sup>12</sup>.

## 2.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-111-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS.

Esta Norma Oficial Mexicana establece el método general para determinar el número de mohos y levaduras viables presentes en productos destinados al consumo humano por medio de la cuenta en placa a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ <sup>13</sup>.

Por otra parte, el abastecimiento de agua para uso y consumo humano con calidad adecuada es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades gastrointestinales y otras, para lo cual se requiere establecer límites permisibles en cuanto a sus características microbiológicas, físicas, organolépticas, químicas y radiactivas; con el fin de asegurar y preservar la calidad del agua en los sistemas, hasta la entrega al consumidor, se debe someter a tratamientos de potabilización a efecto de hacerla apta para uso y consumo humano, lo cual se rige con las siguientes Normas<sup>14</sup>.

## 3.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-127-SSA1-1994, "SALUD AMBIENTAL, AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO - LÍMITES PERMISIBLES DE CALIDAD Y TRATAMIENTOS A QUE DEBE SOMETERSE EL AGUA PARA SU POTABILIZACIÓN"

Establece los límites permisibles de calidad y los tratamientos de potabilización del agua para uso y consumo humano, que deben cumplir los sistemas de abastecimiento públicos y privados o cualquier persona física o moral que la distribuya, en todo el territorio nacional. El agua abastecida por el sistema de distribución no debe contener *E. coli* en ninguna muestra de 100 ml. Los organismos coliformes totales no deben ser detectables en ninguna muestra de 100 ml; en sistemas de abastecimiento de localidades con una población mayor de 50 000 habitantes, estos organismos, deberá estar ausentes en el 95% de las muestras tomadas durante cualquier período de doce meses<sup>15</sup>.

El contenido de organismos resultante del examen de una muestra simple de agua, debe ajustarse a lo establecido en la Norma<sup>15</sup>.

#### 4.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

Esta Norma está orientada a proporcionar las guías generales para la preparación de diluciones para el examen microbiológico de alimentos. En vista de la gran cantidad de productos en este campo de aplicación, estas guías pueden ser inapropiadas para todos ellos en forma detallada y para otros requerirse otros métodos diferentes. Sin embargo, en todos los casos donde sea posible se recomienda apearse a estas guías y modificarse únicamente cuando sea necesario. La dilución primaria tiene por objeto obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos contenidos en la muestra destinada para el análisis.

La preparación de diluciones decimales adicionales, si son necesarias, tiene como objetivo reducir el número de microorganismos por unidad de volumen, para permitir, después de la incubación, la observación de la prueba en el caso de tubos o matraces y la cuenta de colonias en el caso de placas<sup>16</sup>.

#### 5.- NORMA OFICIAL MEXICANA (CON CARACTER DE EMERGENCIA) NOM-EM-034-FITO-2000, REQUISITOS Y ESPECIFICACIONES PARA LA APLICACIÓN Y CERTIFICACIÓN DE BUENAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS EN LOS PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS.

Norma Oficial Mexicana (NOM) que tiene por objeto establecer los requisitos y especificaciones para la aplicación y certificación de Buenas Prácticas Agrícolas en los procesos de producción de frutas y hortalizas frescas. Estos requisitos y especificaciones son de observancia obligatoria en todo el territorio nacional para las unidades de producción que pretendan obtener esta certificación y usar la contraseña oficial para identificar sus productos<sup>17</sup>.

## 6.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-251-SSA1-2009, PRÁCTICAS DE HIGIENE PARA EL PROCESO DE ALIMENTOS, BEBIDAS O SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS.

Esta Norma Oficial Mexicana establece los requisitos mínimos de buenas prácticas de higiene que deben observarse en el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios y sus materias primas a fin de evitar su contaminación a lo largo de su proceso<sup>18</sup>.

Por otra parte, en México existe un plan preventivo para reducir los riesgos de contaminación por microorganismos patógenos (*Cyclospora cayetanensis*., *Listeria spp.*, *E. coli* y *Salmonella spp.*), durante la producción, empaque y distribución de cilantro, para su comercialización dentro y fuera del país. Teniendo este plan como objetivo general desarrollar un programa que establezca los requisitos que deben cumplir los productores, empacadores y exportadores de cilantro en México para comercializar su producto dentro y fuera del país, aplicando Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC), a fin de prevenir, reducir o eliminar la contaminación por microorganismos patógenos; así como establecer las actividades y condiciones que deberán cumplir aquellos acopiadores, empacadores, distribuidores y comercializadores que pretendan exportar cilantro a los EUA o que tengan antecedentes de detección de microorganismos patógenos por la autoridad nacional o del mercado de destino<sup>19</sup>.

### 2.3 GENERALIDADES DE LA FRESA

El nombre científico de este fruto es *Fragaria vesca*. La planta es de tipo herbáceo, en tanto el sistema radicular es fasciculado y se compone de raíces y raicillas. Es pequeña, de no más de 50cm de altura, con numerosas hojas originadas en una corona o rizoma muy corto que se encuentra a nivel del suelo y constituye la base de crecimiento de la planta. Las flores son blancas, organizadas en cimas y tienen cáliz de 5 piezas hendidas, 5 pétalos redondeados y numerosos estambres y pistilos. El fruto es resultado de la agregación de muchos carpelos secos diminutos sobre un receptáculo pulposo hipertrofiado; mide cerca de 1 cm de largo, es rojo, tiene sabor dulce y presenta aroma característico<sup>20</sup>.

## 2.4 USO DE DESINFECTANTES EN FRUTAS Y HORTALIZAS

Ante la problemática de la falta de observancia de las normas anteriormente mencionadas en algunos segmentos de la población, es indispensable el uso de desinfectantes, que son agentes antimicrobianos empleados solamente sobre objetos inanimados o medios inertes. Algunos son tóxicos celulares protoplasmáticos con capacidad para destruir tejidos vivos. Para la FDA (Food and Drugs Administration) los desinfectantes son “sustancias químicas capaces de destruir en 10 o 15 minutos los gérmenes depositados sobre material inerte; deben alterar lo menos posible el sustrato sobre el que actúan. Es deseable que destruyan todas las formas vegetativas de las bacterias, además de los hongos y los virus”<sup>21</sup>.

No existe ningún agente químico antimicrobiano que sea el “mejor” para todos y cada uno de los casos, dada la diversidad de circunstancias en que puedan utilizarse estos agentes y la composición de las células microbianas sobre las que actúan.

Los desinfectantes químicos comerciales disminuyen considerablemente la carga bacteriana, sin embargo, de estos sólo algunos destruyen quistes y ninguno logra aniquilar los huevos de parásitos. Pueden encontrarse quistes (amibas y *Giardia*), o bien, huevos (gusanos o lombrices intestinales como *Taenia solium*, *Áscaris* o *Trichinella*) cuya eliminación resulta difícil debido a su resistencia<sup>22</sup>.

Entre las formulaciones comerciales para desinfectar se encuentran:

1. Las que contienen plata coloidal.
2. Halógenos: cloro, dióxido de cloro, yodo, bromo.
3. Fosfato Trisódico (FTS), Compuestos de amonio cuaternario (Quats), Ácidos Orgánicos.
4. Oxígeno “activo”: peróxido de hidrógeno, ácido peracético, ozono
5. Detergentes<sup>21, 22</sup>.

Las frutas y hortalizas frescas tienen riesgo de contaminarse con peligros biológicos (bacterias, virus y parásitos) en las diferentes fases de producción (cosecha y postcosecha) y en las fases posteriores (transporte, empaque, venta al por menor, preparación en establecimientos de expendio de comida o en hogares)<sup>23</sup>.

En las operaciones de lavado e hidro enfriado de productos vegetales se utilizan concentraciones entre 100-200 ppm, aunque concentraciones menores reducen la mayor parte de bacterias y hongos. Conviene comenzar las operaciones diarias con concentraciones bajas (100-150 ppm) para aumentar la cantidad de cloro en solución, a medida que el agua se va ensuciando con restos vegetales y por el incremento de la cantidad de esporas suspendidas en el agua. Por las razones antes expuestas, los parámetros recomendados al aplicarse hipoclorito (de sodio o calcio) en las empacadoras deben tener presente la reutilización del agua, la constante aportación de materia orgánica a medida que se introduce más materia prima, el volumen de frutas y hortalizas que se manipula y la aportación de fluidos vegetales, dado que habitualmente se trocean frutas y hortalizas antes de su higienización. Es preciso una exposición de entre 3 y 5 minutos para conseguir una desinfección adecuada, pero además del pH y de la cantidad de impurezas, también es importante la temperatura de la solución, puesto que el frío disminuye su eficacia. Es recomendable realizar lavados secuenciales; por ejemplo, con un lavado inicial para eliminar la tierra, suciedades y restos vegetales, seguido de una desinfección para acabar después con un aclarado. La agitación o cepillado contribuye a un mejor trabajo<sup>24</sup>.

En la Unión Europea, el cloro activo liberado de hipoclorito de sodio y de calcio, como sustancia activa para lavar frutas y hortalizas, está autorizado por el Reglamento (UE) 2017/1274. En Canadá, el Reglamento SOR / 2018-108 para alimentos seguros de la Agencia de inspección de alimentos permite una concentración entre 100-150 ppm de cloro total o entre 2 y 7 ppm de cloro residual libre con un pH entre 6 y 7 con un tiempo de contacto de 5 minutos. Las concentraciones de hipoclorito de sodio entre 50 a 200 ppm., con un tiempo de

contacto de 1 a 2 minutos, consiguen una reducción de la carga microbiana de entre 1 y 2 LogUFC/cm<sup>2</sup>. Para *E. coli* concentraciones de cloro de 100 ppm y 50 ppm con inmersión entre 2-5 minutos y temperatura de 5°C lograron reducciones de 2.2-2.4 y 1.9-2.6 Log UFC, respectivamente<sup>24</sup>.

En los países centroamericanos los desinfectantes están permitidos con la condición de que el desinfectante cuente con el registro. El hipoclorito cuenta con registro en todos los países miembros del OIRSA (México, Belice, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y República Dominicana)<sup>24</sup>.

El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala, a través de la Guía Técnica para el Tratamiento y Desinfección de Agua para consumo Humano, la cual fue elaborada con el auspicio de la Oficina Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), recomienda el uso de 1 ppm de cloro para la manipulación de agua a nivel domiciliario en condiciones normales y 2 ppm de cloro en situación de emergencia. Para la desinfección de frutas y verduras, la Guía mencionada recomienda entre 10 ppm de cloro, es decir 10 veces la dosis de cloro para tratamiento de agua en condiciones normales. En el Manual, para la preparación y venta de frutas y hortalizas frescas se recomienda, en establecimientos de alimentos, el uso de cloro a una concentración de:

- 50 ppm de cloro para desinfectar frutas.
- 100 ppm de cloro para hortalizas y otros vegetales.

Para la desinfección de vegetales de consumo fresco, en establecimientos de preparación de alimentos para venta al por menor y en hogares, se recomienda llevar a cabo el siguiente procedimiento: 1. Preparar la solución para la desinfección a una concentración de 50-100 ppm de cloro.

2. Lavar los vegetales bajo el chorro de agua hasta eliminar todos los restos del suelo.

3. Introducir los vegetales para desinfectar inmediatamente después de preparar la solución.

4. Dejarlo en reposo durante 3-5 minutos.
5. Aclarar los vegetales bajo un chorro de agua potable corriente.
6. Escurrir los vegetales.
7. Trocear los vegetales, si procede<sup>24</sup>.

En los últimos años se ha estado probando el uso de nanopartículas de plata como agente terapéutico en Ciclosporiasis experimental, en donde se sintetizaron químicamente estas nanopartículas para evaluar por primera vez sus efectos anticiclospora en ratones experimentales inmunocompetentes e inmunodeprimidos en comparación con el tratamiento estándar. El efecto de las nanopartículas de plata se evaluó mediante el estudio de la carga de ooquistes en las heces, la viabilidad de los ooquistes, los cambios ultraestructurales en los ooquistes y la estimación del interferón gamma sérico. Los animales que recibieron estas nanopartículas mostraron una disminución estadísticamente significativa en la carga de ooquistes y el número de ooquistes viables en las heces, así como un aumento estadísticamente significativo en el interferón gamma en suero en comparación con el grupo correspondiente que recibió el tratamiento estándar y el grupo de control infectado no tratado. El examen con microscopio electrónico de barrido reveló ooquistes mutilados con irregularidades, poros y perforaciones. Los resultados bioquímicos no mostraron evidencia de toxicidad de las nanopartículas de plata, ya que los sueros de los ratones mostraron una disminución estadísticamente no significativa de las enzimas hepáticas en los subgrupos inmunocompetentes y una disminución estadísticamente significativa en los subgrupos inmunodeprimidos<sup>25</sup>.

Se están considerando otros métodos alternativos para la desinfección para algunos agentes patógenos incluyendo en estos a *Giardia*, y los ácidos orgánicos han llamado la atención debido a los subproductos de la desinfección. Los perácidos como el ácido peracético (PAA) y el ácido perfórmico (PFA) son peróxidos orgánicos. Los mecanismos de desinfección sugeridos de PAA se basan en la liberación de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) como

radicales hidroxilos, alcoxilo e hidroperoxilo y superóxido. Un estudio evaluó la eficiencia de desinfección de PFA contra varios contaminantes microbianos, incluida *Giardia*, en aguas residuales tratadas. Si bien la mayoría de los microorganismos ya se inactivaron eficientemente con 2 mg de PFA/L en 5 minutos, para el quiste de *Giardia* esto el valor fue de 10 mg PFA/L<sup>26</sup>.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como ya se sabe, las infecciones parasitarias son un problema de salud en todo el mundo, con un gran impacto en nuestro país, ya que se tienen datos de frecuencia de las enfermedades parasitarias obtenidos por encuestas epidemiológicas en donde los grupos de edad más afectados son los extremos de la vida y personas que cursan algún padecimiento, siendo la transmisión frecuentemente por fecalismo y el consumo de frutas crudas; esto llevado de la mano por el riego de los cultivos con aguas contaminadas<sup>2</sup>.

Por lo anterior, en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del Hospital Infantil de Morelia, se llevó a cabo una investigación con la finalidad de analizar un producto de consumo frecuente en nuestro medio como es la fresa, debido que en temporada, aumenta su consumo por la disminución del precio de la fruta, y porque se produce en grandes extensiones agrícolas que en ocasiones son regadas con aguas negras, las cuales entran en contacto directo con la planta y muy cerca del fruto, dado que crecen al ras del suelo, lo que promueve la facilidad de contaminación parasitaria; identificando el tipo de parásitos que tienen las fresas expandidas en diferentes establecimientos, definiendo las características de las contaminadas con parásitos, determinando además el grado de confiabilidad de los estudios coproparasitoscópicos, el lavado Tween al 20% y la solución salina Isotónica para identificar parásitos.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos también conocidas como ETA, son un grave problema de salud a nivel mundial, y ocurre por la contaminación de los alimentos ya sea por bacterias, virus, hongos o parásitos. Estas enfermedades pueden clasificarse como: infecciones, intoxicaciones o infecciones mediadas por toxinas. La contaminación ocurre en cualquier etapa de la cadena de producción (riego con aguas tratadas o semi tratadas, fauna nociva), suministro y consumo de estos<sup>27,28</sup>.

Un brote se define como dos o más casos asociados epidemiológicamente entre sí. La existencia de un caso único bajo vigilancia en una zona donde no existía el padecimiento también se le considera brote. Un brote sucede por el aumento inusual del número de casos de una enfermedad más allá de lo normal. Puede tener una diseminación localizada en un espacio específico (por ejemplo, una comunidad, un pueblo, un barco o una institución cerrada) o extenderse a varios países. Puede durar varios días, varias semanas o incluso varios años<sup>29</sup>.

Asociados a aguas de bebida se han descrito brotes de parasitosis en EEUU, Canadá, Japón y Brasil; en la India, Sudáfrica y México también se han demostrado brotes asociados significativamente a lluvias estacionales. En Europa se han documentado en los últimos años más de 20 brotes, la mayoría en Inglaterra y Gales y asociados a lluvias torrenciales. Se han demostrado elevados niveles de contaminación por *Cryptosporidium* y *Giardia* en estudios realizados sobre aguas de bebida en Holanda, Canadá y Australia, en diversos lugares de Asia como Taiwan (el 40% de las muestras de agua potable) y Japón (del 37 al 100% de las muestras, dependiendo del área)<sup>30</sup>.

Estudios realizados en nuestro continente también han demostrado la presencia de parásitos en fuentes de agua, por ejemplo en Venezuela, se realizó la identificación de parásitos intestinales en agua de pozos profundos de cuatro municipios, se observó la presencia de parásitos intestinales en 37.5 % de las muestras procesadas (21/56 pozos muestreados), siendo variable para cada municipio estudiado, Girardot (18.2 %), José Ángel Lama (20.0 %), Libertador

(57.1 %), Francisco Linares Alcántara (70.0 %). Con respecto a la distribución de los grupos de parásitos, se evidenció que los protozoarios fueron los más frecuentes en los cuatro municipios (90 %); solo se observó la presencia de huevos de helmintos en el municipio Francisco Linares Alcántara <sup>31</sup>.

Por otra parte, en una comunidad rural del municipio de Consolación del Sur, Cuba, se estudió la prevalencia y los factores de riesgo de las infecciones parasitarias, en el análisis univariante realizado se identificó que el suministro de agua de pozo o río (OR(Razón de posibilidades)= 4.36, IC 95 %: 1.57, 12.14) era un factor asociado con infecciones de helmintos intestinales, mientras que tres factores se asociaron con infecciones por protozoos patógenos intestinales que incluyen el trabajo de granja (OR = 6.15 IC 95 %: 3.22, 11.74), el agua de pozo o río IC(Intervalo de confianza) (OR = 2.41, 95 %: 1.24, 4.71) y comer frutas y vegetales sin lavar (OR = 2.75, IC 95 %: 1.33, 5.66)<sup>32</sup>.

Existen pocos estudios de búsqueda de parásitos en frutas, y específicamente en fresas, por lo que mencionaremos primeramente algunos estudios realizados para búsqueda de parásitos en vegetales y frutas en general.

En un estudio en Nigeria, en donde se evaluó la prevalencia y distribución de parásitos de importancia para la salud humana en frutas y verduras de ese país se determinaron a través de una revisión sistemática y un metaanálisis de los datos publicados. Se utilizó el modelo de efectos aleatorios para determinar la estimación de prevalencia agrupada (EPP). La heterogeneidad fue evaluada por la Q-prueba de Cochran. Se observó un EPP general de parásitos del 32.4% (IC ó Intervalo de confianza del 95%: 0.73 a 0.91) de 19 estudios elegibles notificados en 13 estados nigerianos. Los subgrupos de PPA variaron entre 3.5% (IC95%: 0.45, 1.86) y 58.5% (IC95%: 1.40, 4.09). Se observó un alto grado de heterogeneidad del 97.53% (IC95%: 0.30, 0.46,  $P:0.000$ ) dentro de los estudios y subgrupos. Las especies de *Cryptosporidium* fueron las más prevalentes, mientras que *Ancylostoma duodenale* y *Ascaris lumbricoides* tuvieron la distribución geográfica más amplia. La piña (prev: 41.3%, IC 95%: 0.40, 0.75) y la lechuga

(prev: 51.5%, IC 95%: 0.37, 0.68) registraron el mayor nivel de contaminación parasitaria. Los autores concluyen que los parásitos de importancia para la salud humana son frecuentes en las frutas y verduras comestibles en Nigeria, así mismo que las estimaciones de prevalencia fueron más elevadas en la región sudoriental y durante el decenio más reciente<sup>33</sup>.

Mientras que, en Irán, se recolectaron 34 muestras de vegetales prelavados que incluyen espinaca, menta, perejil, orégano, cebollino, ajedrea, rábano, cilantro, albahaca y estragón de los mercados locales en la ciudad de Tonekabon, al norte del país. Todas las muestras de vegetales se lavaron con PBS estéril. Se realizaron exámenes parasitológicos, incluido el examen directo y la tinción con yodo de Lugol y Ziehl-Neelsen modificado, en el sedimento resultante del proceso de lavado. Los hallazgos mostraron que 14/34 (41.17%) de las muestras recolectadas estaban contaminadas con al menos un parásito. Se encontraron huevos de *Toxocara* sp., *Ascaris* sp., *Fasciola* sp., *Toxascaris leonina*, *Trichuris* sp y *Enterobius* junto con larvas de vida libre, quiste de ameba, quiste de *Entamoeba coli* y oocisto de *Cryptosporidium* sp., entre las muestras positivas. Además, el análisis estadístico indicó que no había una correlación significativa entre la contaminación parasitaria de hortalizas y los cambios estacionales<sup>34</sup>.

En otro estudio que tuvo como objetivo detectar la contaminación parasitaria en vegetales frescos vendidos en el mercado central al aire libre de la ciudad de Tarcha, Etiopía. Se recolectaron un total de 270 muestras de frutas y verduras frescas del mercado principal de la ciudad entre el 1 de agosto de 2017 y el 22 de agosto de 2017. Las muestras se examinaron microscópicamente para detectar parásitos de importancia médica después de lavarlas con 500 ml de solución salina normal y 24-hr sedimentación de la solución de lavado seguida de centrifugación a 2000 g durante 5 minutos. De las 270 muestras de frutas y verduras frescas, 115 (42.6%) resultaron positivas para parásitos intestinales. Se registró un alto nivel de contaminación en muestras de frutas y verduras frescas en el repollo 71.1% (32/45) mientras que el tomate fue el menos contaminado

24.4% (11/45). Los parásitos de importancia médica identificados fueron *Entamoeba histolytica/ dispar*, *Giardia intestinalis*, *Ascaris lumbricoides*, *Hymenolepis nana*, *Toxocara* spp, *Hymenolepis diminuta* y *Cystoisospora belli*. El parásito más predominante encontrado fue *Ascaris lumbricoides* (16.7%) mientras que *Cystoisospora belli* (2.6%) el menos detectado. Todas las verduras y frutas tenían más de una especie de parásito. También se observó una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de vegetales y la presencia de parásitos ( $p = 0.002$ ). El repollo fue el producto más contaminado (71.1%), seguido de la lechuga y el pimiento verde (44.4% cada uno), aguacate (37.8%), zanahoria (33.3%). El tomate (24.4%) resultó ser el menos contaminado<sup>35</sup>.

Otro estudio informa sobre la presencia de *Cyclospora*, *Cryptosporidium* y *Giardia* en ensaladas precortadas y verduras de hoja verde compradas al por menor en Ontario, Canadá. Se recolectaron un total de 544 muestras minoristas entre abril de 2009 y marzo de 2010 e incluyeron una variedad de mezclas para ensaladas y verduras de hojas verdes individuales. La mayoría de estos productos se cultivaron en los Estados Unidos, con algunos de Canadá y México. Los parásitos se eluyeron y concentraron antes de la detección mediante PCR y microscopía de inmunofluorescencia. Las secuencias de ADN se alinearon con secuencias de referencia en GenBank. *Cyclospora* spp. fueron identificados por polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de PCR en nueve muestras (1.7 %) y por análisis de secuencia de ADN. *Cryptosporidium* spp. fueron identificados en 32 (5,9%) muestras; 29 fueron secuenciados y alineados con la especie zoonótica *Cryptosporidium parvum*. Se identificó *Giardia duodenalis* en 10 muestras (1,8 %), y de las 9 muestras secuenciadas con éxito, 7 se alinearon con el ensamblaje B de *G. duodenalis* y 2 con el ensamblaje A, ambos también zoonóticos. La presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* se confirmó en algunas de las muestras PCR positivas mediante microscopía, mientras que se observaron ooquistes similares a *Cyclospora* en la mayoría de las muestras PCR positivas de *Cyclospora*<sup>36</sup>.

Por otra parte, en Corea se recolectaron 6 tipos de vegetales (hojas de perilla, coles cultivadas en invierno, cebolletas, brotes, arándanos y tomates cherry) desde julio de 2014 hasta junio de 2015, y se investigó la contaminación por *Cryptosporidium* y *Cyclospora* utilizando PCR multiplex cuantitativos en tiempo real. Entre 404 verduras, *Cryptosporidium* y *Cyclospora* se detectaron en 31 (7.7%) y 5 (1.2%) muestras, respectivamente. Además, se aisló *Cryptosporidium* de los 6 tipos de vegetales, mientras que *Cyclospora* se detectó en 4 tipos de vegetales (excepto las hojas de perilla y las cebolletas). *Cryptosporidium* (17.8%) y *Cyclospora* (2.9%) tuvieron las tasas de detección más altas en cebolletas y coles cultivadas en invierno, respectivamente. Se detectó *Cryptosporidium* durante todo el año; sin embargo, *Cyclospora* se detectó solo de octubre a enero.

En dos muestras (brote y arándano), se detectaron tanto *Cryptosporidium* como *Cyclospora*. Investigaciones adicionales utilizando PCR con enzimas de restricción y PCR anidada confirmaron *Cryptosporidium parvum* y *Cyclospora cayetanensis*, respectivamente. Los autores hacen énfasis en que detectaron *C. cayetanensis* en hortalizas por primera vez en Corea<sup>37</sup>.

Se evaluaron protocolos para recuperar quistes de *Giardia spp.* en *Brassica oleracea* (repollo) y *Lactuca sativa* (lechuga) mediante concentración con soluciones de formalina / éter y microscopía o inmunofluorescencia o amplificación de ADN mediante PCR. Para evaluar esta metodología, se inocularon quistes de *G. duodenalis* por triplicado (10 quistes) en muestras de 35 g de lechuga y col. El método que obtuvo el mayor porcentaje de recuperación en el repollo fue la solución de ácido sulfámico más agitación con stomacher (47.7% ± 7.5). Para la lechuga, el mejor método fue la solución de glicina más agitación con Stomacher (46.6% ± 5.3). El acuerdo entre observadores fue de 0,99. *Giardia* se detectó amplificando secuencias específicas para el ADN que codifica el ARNr de SSU. En 27 muestras de lechuga y 27 muestras de repollo, obtenidas de supermercados y vendedores ambulantes, dos muestras de lechuga (7.4%) y una muestra de

repollo (3.7%) fueron positivas para *Giardia* mediante ensayo de PCR y se secuenciaron, determinando que eran dos del ensamblaje B y uno de lechuga para ensamblaje E. Este método se propone para detectar *Giardia* en hortalizas mediante detección por PCR, permitiendo a las autoridades de salud pública identificar los genotipos circulantes en los alimentos, lo que ayudará a establecer medidas que reduzcan los brotes de enfermedades parasitarias asociadas a los alimentos contaminados<sup>38</sup>.

Los estudios para búsqueda de parásitos en fresas incluyen uno realizado en 18 granjas en cinco distritos en Guangzhou, China, donde se examinaron 54 muestras de fresas compuestas, con o sin evidencia de daños en el forrajeo de roedores o aves (mordidas), en donde se obtuvieron los siguientes resultados: *Cryptosporidium* fue detectado en 7/18 muestras (39%) de las fresas mordidas, 4/18 (22%) del borde, y 5/18 (28%) de muestras centrales de la fresa, respectivamente. Se detectaron *Salmonella* y *Giardia* en <4% de muestras de fresas<sup>39</sup>.

En otro estudio realizado en 2017, se desarrolló un nuevo método validado de la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA BAM) para la detección de *C. cayetanensis* en productos mediante PCR en tiempo real. El estudio se realizó en bayas (fresas y frambuesas). Este estudio mostró que el límite de detección para el análisis de qPCR centrado en la región ITS puede ser de 10 ooquistes/ 30 g de bayas<sup>40</sup>.

Por otra parte, en una investigación sobre la presencia de parásitos patógenos humanos en fresas cultivadas en el Distrito Federal de Brasil, se evaluaron un total de 48 muestras de fresas provenientes de 16 productores de la fruta. Los productores incluidos en este estudio fueron seleccionados utilizando datos de registro de EMATER (Empresa de Asistencia y Extensión Rural), esto durante el periodo comprendido de junio a septiembre de 2013. En cada propiedad se recolectaron manualmente tres muestras de 20-22 fresas. Cada muestra pesó aproximadamente 0.2 Kg. Se detectaron contaminantes en el 56% de los 16 productores de fresa. Las fresas estaban contaminadas con *Schistosoma*

*mansoni*, *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Balantidium coli*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana*, además de amebas de vida libre, nemátodos y ácaros no identificados<sup>41</sup>.

## **5. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Las fresas adquiridas en los mercados municipal, ambulante y supermercado se encuentran contaminados con parásitos, con mayor frecuencia en los que se expenden al aire libre, y las técnicas de lavado tienen diferentes grados de recuperación de las formas parasitarias.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la presencia de parásitos en fresas expendidas en mercados de Morelia, Michoacán. México

### **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar parásitos en fresas que se venden en mercados de Morelia durante septiembre de 2021.
2. Identificar las características de las fresas asociadas a la presencia de parásitos.
3. Valorar la confiabilidad del estudio coproparasitológico y del lavado Tween 20% y solución salina isotónica para identificar parásitos en las fresas.

## **7. MÉTODOS Y MATERIALES**

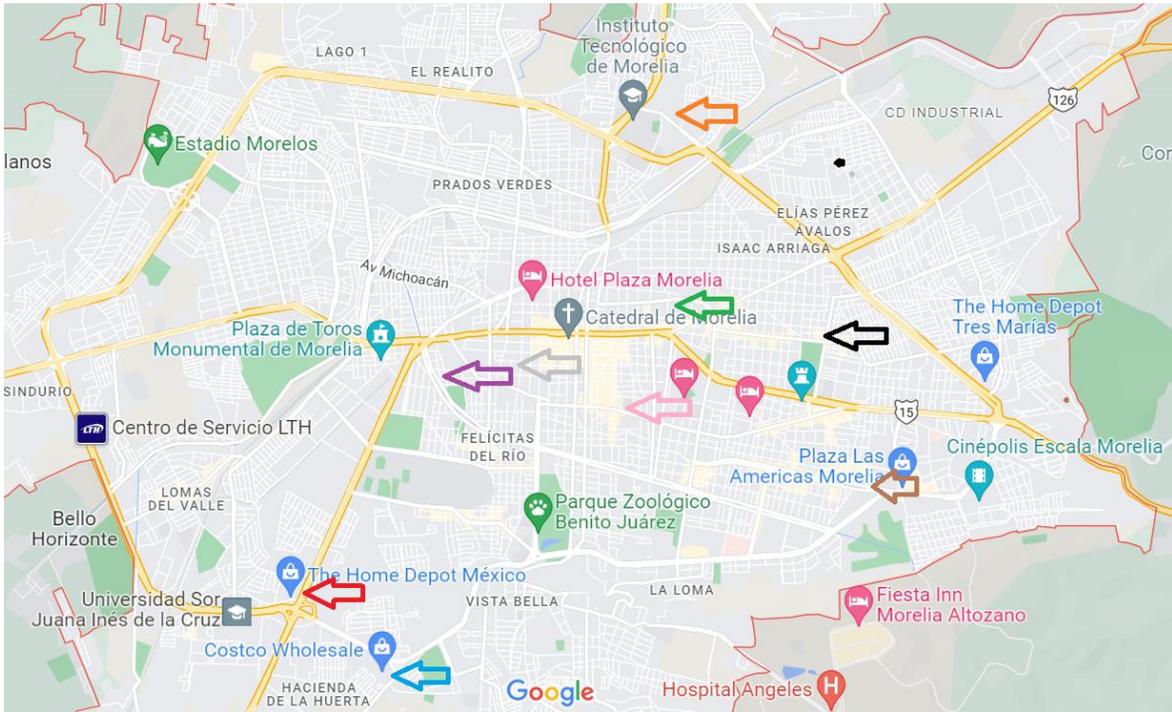
Este es un estudio de tipo descriptivo, prospectivo, experimental, realizado en fresas adquiridas en mercados municipales, ambulantes y supermercados de la ciudad de Morelia.

El muestreo fue llevado a cabo una vez por semana en el mes de septiembre del 2021. Las frutas fueron adquiridas por medio de la compra y pesadas por el vendedor, quien colocó 500 g de fresas en bolsas plásticas, transparentes y nuevas en las que se trasladaron al Laboratorio de Microbiología y Parasitología del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”, ahí se eligieron al azar las piezas para este estudio.

Se analizaron 15 muestras de cada uno de los siguientes mercados de Morelia, Michoacán, tres mercados ambulantes (Tianguis de la Feria, Tianguis del Panteón, Tianguis de la Colonia Eréndira), tres mercados municipales (San Juan, Santo Niño e Independencia) y tres de Super mercados (Walmart la Huerta, Walmart Express y Soriana), eligiendo al azar el puesto donde fueron adquiridas y se seleccionaron 15 ejemplares, dando un total de 135 muestras, recolectadas durante tres semanas (Tabla 1) (Mapa 1)

<b>MERCADO</b>	<b>FECHA DE COMPRA</b>	<b>NÚMERO DE MUESTRAS</b>
<b>Tianguis de la Feria</b>	13/sep/2021	15
<b>Tianguis del Panteón</b>	06/Sep/2021	15
<b>Tianguis de la Colonia Eréndira</b>	20/Sep/2021	15
<b>San Juan</b>	06/Sep/2021	15
<b>Santo Niño</b>	13/Sep/2021	15
<b>Independencia</b>	20/Sep/2021	15
<b>Walmart la Huerta</b>	13/Sep/2021	15
<b>Walmart Express</b>	20/Sep/2021	15
<b>Soriana</b>	06/Sep/2021	15
<b>TOTAL</b>		135

Tabla 1. Calendario de recolección de muestras



Mapa 1. Localización de los Mercados y Super mercados muestreados.

- Rojo: Walmart La Huerta
- Azul: Soriana
- Café: Walmart Express
- Verde: Mercado de San Juan
- Gris: Mercado Santo Niño
- Rosa: Mercado Independencia
- Naranja: Tianguis de La Feria
- Negro: Tianguis de la Col. Eréndira
- Morado: Tianguis del Panteón

Para la búsqueda de enteroparásitos, primeramente, se observó el aspecto de la fruta registrándolo como bueno (fruta integra, de forma cónica y consistencia firme, color rojo intenso y brillante y olor habitual), deteriorado (si al menos una de las características esta alterada) y malo (fruta no integra, con color y olor alterados), considerando que el peso aproximado de cada pieza es de 5 g.

Cada fruta se partió por la mitad, quedando dos fracciones a las que se les llamó A y B las cuales fueron colocadas de manera individual en una bolsa, a la parte A se le agregaron 15 ml de la solución de lavado 1 (Solución salina isotónica) (Anexo 1), mientras que a la otra mitad (B) se le agregó 15 ml de la solución de lavado 2 (Tween 20 al 20%) (Anexo 2). Posteriormente, las soluciones de lavado se procesaron por las técnicas de examen directo en fresco (Anexo 3), de Sacarosa (Anexo 4) y Formol-Éter modificado (Anexo 5) y fueron leídas con objetivos seco débil y seco fuerte. Cuando fue necesario, se realizó la medición microscópica de los parásitos (Anexo 6), siguiendo el procedimiento descrito en la tabla 2.

Muestras/Semana	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
		Procesamiento de muestras	Procesamiento de muestras	Procesamiento de muestras	Recopilación y organización de resultados
<b>Semana 1</b> <b>Domingo compra de las frutas</b> <b>15 MER</b> <b>15 AMB</b> <b>15 TIEN</b>	Lavado, examen en fresco preparación de material para procesamiento	Sheater, lectura de laminillas	Formol/Éter, lectura de laminillas	Formol/Éter, lectura de laminillas	TOTAL: 45 muestras
<b>Semana 2</b> <b>Domingo compra de frutas</b> <b>15 MER</b> <b>15 AMB</b> <b>15 TIEN</b>	Lavado, examen en fresco preparación de material para procesamiento	Sheater, lectura de laminillas	Formol/Éter, lectura de laminillas	Formol/Éter, lectura de laminillas	TOTAL: 45 muestras
<b>Semana 3</b> <b>Domingo compra de frutas</b> <b>15 MER</b> <b>15 AMB</b> <b>15 TIEN</b>	Lavado, examen en fresco preparación de material para procesamiento	Sheater, lectura de laminillas	Formol/Éter, lectura de laminillas	Formol/Éter, lectura de laminillas	TOTAL: 45 muestras

**TOTAL= 135 MUESTRAS**

Tabla 2. Procedimientos a realizar para el procesamiento y tratamiento estadístico

MER: Mercado Municipal

AMB: Mercado Ambulante

TIEN: Supermercado

Todas las muestras positivas a *Blastocystis spp* y el 10% de las negativas a este parásito, se llevaron al Laboratorio de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” para confirmar la presencia del parásito por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y para determinar si había algún subtipo más frecuente. Primero se realizaron extracciones de ADN del lavado con solución salina isotónica con la técnica de fenol-cloroformo, y enseguida se llevaron a cabo las reacciones de PCR para amplificar el fragmento de 479 pb del gen SSU ADNr de *Blastocystis*.

Se realizaron PCRs punto final con los iniciadores internos *Blast 505-532 Blast 998-1027* y PCR anidada con los iniciadores externos 18S-1-F Y 18S-1-R e iniciadores internos *Blast 505-532 Blast 998-1027* (Anexo 7).

Una vez procesadas las muestras de media fresa en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, se sugirió hacer un nuevo muestreo de las fresas, modificando el número de muestras analizadas. El segundo muestreo se realizó en noviembre del 2021, la unidad de Análisis fue de 20 fresas, de tres mercados ambulantes, tres mercados municipales y tres supermercados de igual manera que en el primer muestreo. De nuevo se registró el aspecto de la fruta usando los criterios mencionados anteriormente, colocando las 20 fresas en una bolsa de plástico, agregando 30 ml de la solución de lavado A (Solución salina Isotónica) (Anexo 1), tomando 15 ml para las técnicas coproparasitológicas directo en fresco (Anexo 3) de sacarosa (Anexo 4) y Formol-Éter modificado (Anexo 5). Los otros 15 ml, se usaron para realizar un cultivo en medio de Jones (Anexo 8), centrifugándolos a 3000 rpm durante 15 minutos, a continuación, se decantó el sobrenadante, recuperando el sedimento y resuspendiendo con 500 microlitros del medio. La mitad del sedimento se suspendió en el medio de cultivo y la otra mitad se congeló para la extracción de ADN y PCRs (Anexo 7).

Se realizó un tratamiento estadístico para observar asociaciones significativas respecto al aspecto de la fruta con la presencia de parásitos en fresas (Anexo 9). Y se realizaron cálculos para valorar la confiabilidad del examen coproparasitológico, del lavado de Tween al 20% y la Solución Salina Isotónica (Anexo 10).

### 7.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Fresas que sean expandidas en el mercado municipal, mercado ambulante y supermercado.

### 7.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Ninguno

### 7.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Ninguno

Variable	Definición operacional	Tipo	Medición, Criterio diagnóstico
<b>Parásitos en fresas</b>	Presencia de parásitos en fresas	Cualitativa nominal	Presencia de protozoarios, huevos de helmintos y larvas de <i>Strongyloides</i> y Uncinarias, mediante, previo lavado y técnicas de concentración de Sheather y Formol/Éter
<b>Mercado</b>	Mercados de Morelia en que se estudiaran fresas para identificar parásitos	Cualitativa nominal	Muestreo en tres mercados municipales, tres mercados ambulantes y tres supermercados
<b>Características de las fresas</b>	Descripción del aspecto de las fresas.	Cualitativa nominal	Características del estado de las fresas que puedan asociarse a la presencia de parásitos: <b>Color:</b> Rojo intenso y brillante <b>Integridad:</b> Cónica y de consistencia firme <b>Olor:</b> Habitual
<b>Confiabilidad de la técnica diagnóstica</b>	Utilidad de la solución salina isotónica, de la solución de Tween, de las técnicas de Sheather y Formol/éter modificado	Cuantitativa	Sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de la solución salina isotónica, de la solución de Tween 20

---

al 20%) y las técnicas de Sheather y Formol/éter modificado, teniendo como estándar de oro al estudio de PCR.

---

Tabla 3. Definición de variables y unidades de medida

#### 7.4 ASPECTOS ÉTICOS.

Esta investigación no presentó riesgos porque se hizo en frutas, sin embargo, se mantendrá la publicación de resultados de la presente investigación en el anonimato y la confidencialidad de los datos de los establecimientos en donde fueron adquiridas las frutas. Para el personal que procesó las muestras se verificó que se tomaran las medidas preventivas estandarizadas de rutina, a fin de evitar un eventual contagio, por lo que fue obligatorio el uso de bata, cubrebocas y guantes.

Antes de la ejecución de este proyecto se sometió el dictamen de los Comités de Investigación del Hospital Infantil “Eva Sámano de López Mateos”.

## 8. RESULTADOS

De las muestras de fresas estudiadas en el primer muestreo, colectadas en septiembre del 2021, el 45.18% (61 muestras) tenían parásitos (Tabla 4), siendo el tianguis de la Colonia Eréndira, en donde las fresas se encontraron mayormente contaminadas (Figura 18).

Mercado	Sin parásitos	<i>Blastocystis</i>	<i>Entamoeba coli</i>	<i>Iodamoeba bustchlii</i>	Protozoarios amebianos y/o flagelados de vida libre	* <i>Blastocystis</i> spp y/o amebas/flagelados de vida libre	Total
Tianguis de La Feria	14	1	0	0	0	0	15
Tianguis del Panteón	4	0	0	0	11	0	15
Tianguis Colonia Eréndira	1	14	1	0	0	0	15
San Juan	2	0	0	0	13	0	15
Santo Niño	13	2	0	0	0	0	15
Independencia	6	2	0	0	3	4	15
Walmart La Huerta	10	5	0	1	0	0	15
Walmart Express	12	3	0	0	0	0	15
Soriana	12	2	0	0	1	0	15

Tabla 4. Parásitos encontrados en los diferentes mercados de Morelia

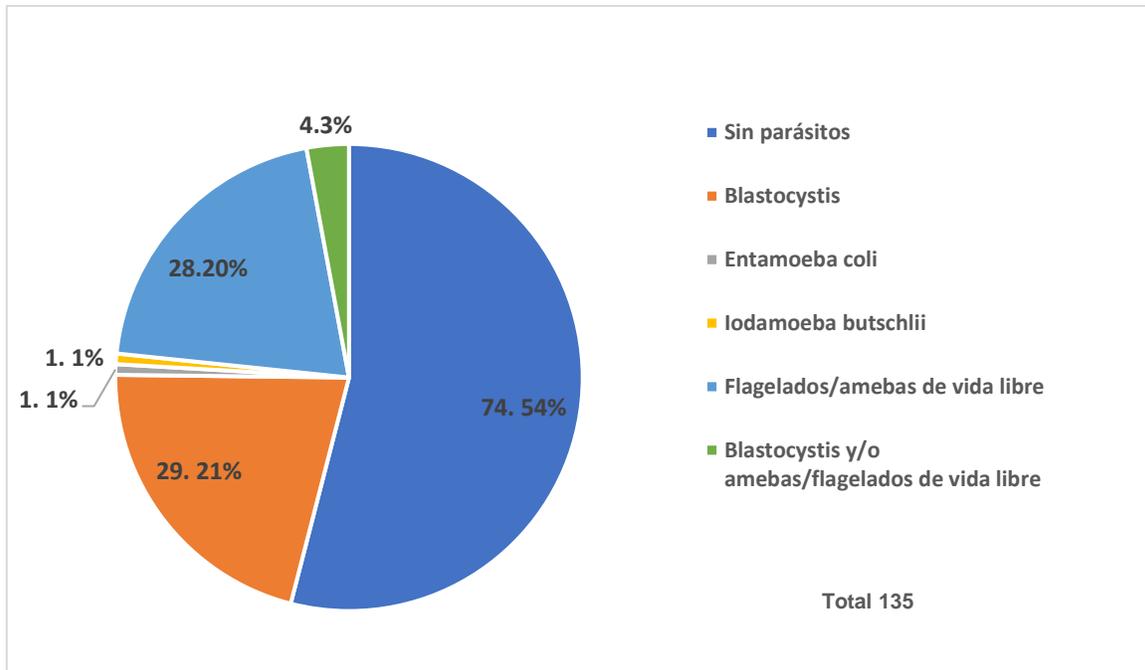


Figura 19. Parásitos en fresas de diferentes mercados de Morelia

Se encontraron tres especies de parásitos intestinales (*Blastocystis spp* (Fotos 1,2), *Entamoeba coli* (Foto 3), *Iodamoeba bustchlii* (Foto 4), así como amebas y/o flagelados de vida libre, cuyas especies no fueron identificadas, siendo el más frecuente *Blastocystis spp*.

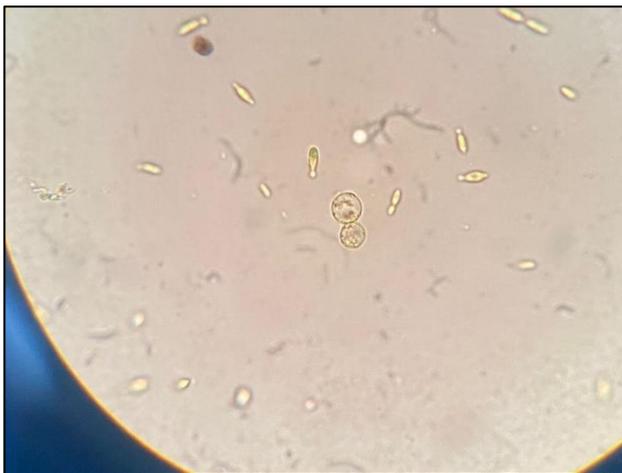


Foto 1. *Blastocystis spp* en división, muestra No. 60



Foto 2. *Blastocystis spp* vacuolar, muestra No. 91



Foto 3. Quiste de *Entamoeba coli* muestra No. 97



Foto 4. Quiste de *Iodamoeba bustchlii* muestra No. 47

Con respecto a la asociación del aspecto de la fruta con la presencia de parásitos, se encontró que, en las muestras sin parásitos, el 58.1% tenían un aspecto bueno, mientras que en las muestras con *Blastocystis* spp y/o amebas y flagelados de vida libre el 45.5% tenían un aspecto bueno, y para los casos en que se visualizaron flagelados y/o amebas de vida libre, poseían aspecto bueno el 21.4% (Tabla 5).

Aspecto	<i>Blastocystis</i>						Total
	Sin parásitos		spp y/o amebas/ flagelados de vida libre		Amebas y/o flagelados de vida libre		
	No	%	No	%	No	%	
<b>Bueno</b>	43	58.1	15	45.5	06	21.4	64
<b>Malo/Deteriorado</b>	31	41.9	18	54.5	22	78.61	71
<b>Total</b>	74	100	33	100	28	100	135

Tabla 5. Porcentaje de parásitos tomando en cuenta los valores obtenidos en el registro de datos.

En los casos de *Blastocystis* spp y amebas y/o flagelados de vida libre, no hubo asociación estadísticamente significativa con el aspecto de la fruta, ya que obtuvimos un valor de  $X^2$  de 1.45, y para las muestras con flagelados y/o amebas de vida libre fue de 10.94 ( $X^2$  tabulada 3.84,  $p=0.05$ ,  $gl=2$ ), (Tabla 6).

	Casos	Valor de $X^2$
Muestras con <i>Blastocystis</i> y/o flagelados/amebas de vida libre	33	1.45
Muestras con Flagelados/amebas de vida libre	28	10.94

Tabla 6. Asociación del aspecto de la fruta con presencia de parásitos.

Tomando como estándar de oro la utilización de la solución salina isotónica para realizar los lavados, calculamos los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para los lavados con tween al 20%, encontrando una sensibilidad del 10%, especificidad de 98.7%, valor predictivo positivo del 75% y un valor predictivo negativo del 73.5%.

En todas las muestras de lavado de media fresca en las que se detectó *Blastocystis* spp. y el 10% de las muestras sin parásitos, elegidas al azar, se realizaron PCRs para la identificación de *Blastocystis*. Se realizaron PCR punto final con oligos internos y PCR anidada con oligos externos e internos; sin embargo, en ninguna de las muestras y con ninguno de los dos métodos se logró amplificar el fragmento de 479 pb del gen SSU ADNr del parásito, dicho fragmento sólo se observó en el control positivo de la reacción (ADN de *Blastocystis* cepa ATCC 610) (Fotos 5-7).

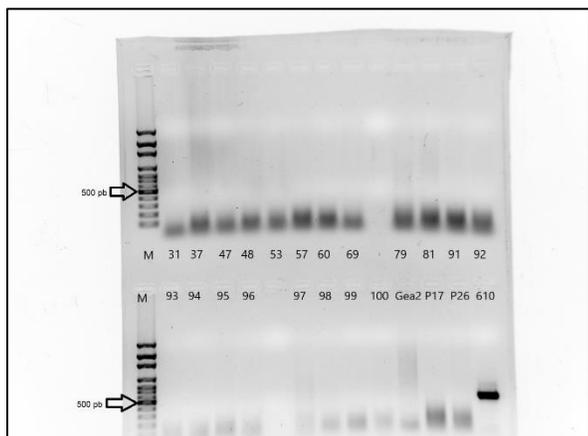


Foto 5. PCR punto final, utilizando el método Santin (iniciadores internos).

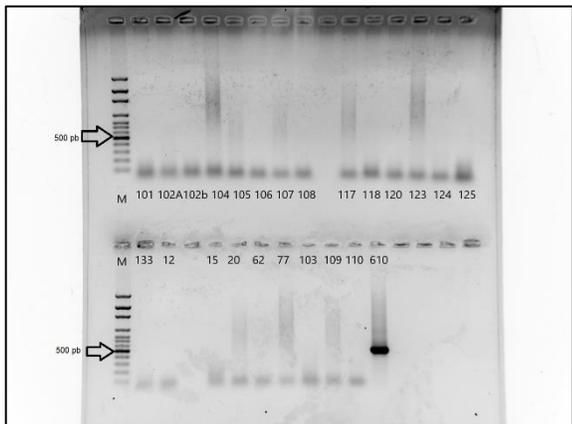


Foto 6. PCR punto final anidado, utilizando iniciadores externos e internos

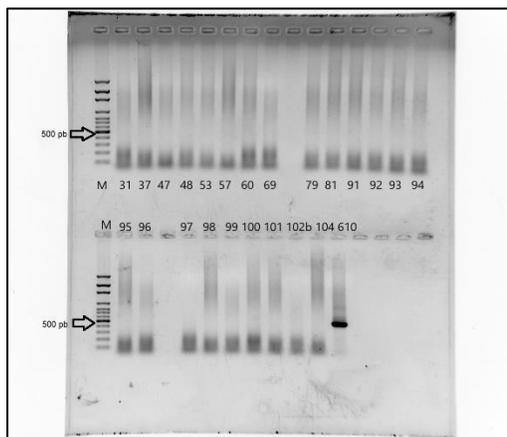


Foto 7. PCR punto final anidado, utilizando iniciadores externos e internos del gen de 18s RNAr.

Dado que no se pudo amplificar el ADN de las muestras, se sugirió realizar un segundo muestreo para la búsqueda específica de *Blastocystis spp*, ampliando la unidad de análisis a 20 fresas. Este segundo muestreo fue realizado en noviembre del 2021, la compra de las fresas se realizó el mismo día en todos los mercados y super mercados anteriormente muestreados. Se encontró que el 44.4% de las fresas tenían parásitos del cual el 33.33 % correspondió a *Blastocystis spp*, siendo el tianguis del Panteón, el mercado de Santo Niño y el Mercado San Juan en donde se encontraron las fresas contaminadas con *Blastocystis spp.*, mientras que en Walmart La Huerta se encontró una Ameba de Vida libre (Tabla 7, Fotos 8-10).

Tipos de mercado	No. Muestras positivas	No. Muestras negativas	Total
Mercados ambulantes	1	2	3
Mercados municipales	2	1	3
Supermercados	1	2	3
<b>Total</b>	4	5	9
<b>Total, en %</b>	44.4%	55.5%	100%

Tabla 7. Distribución de parásitos en diferentes mercados de la Ciudad Morelia. Segundo muestreo.

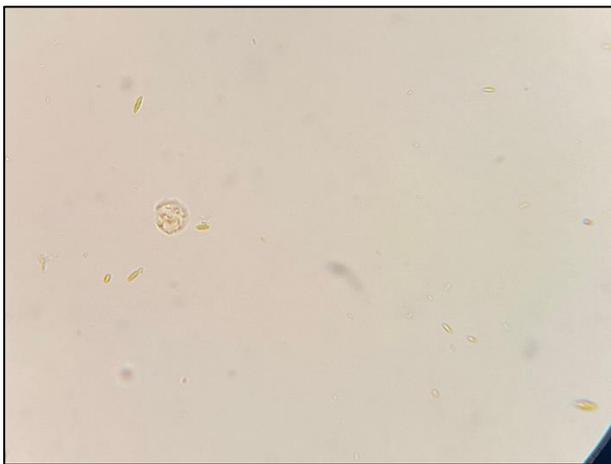


Foto 8. *Blastocystis spp.* granular. Muestra 138.

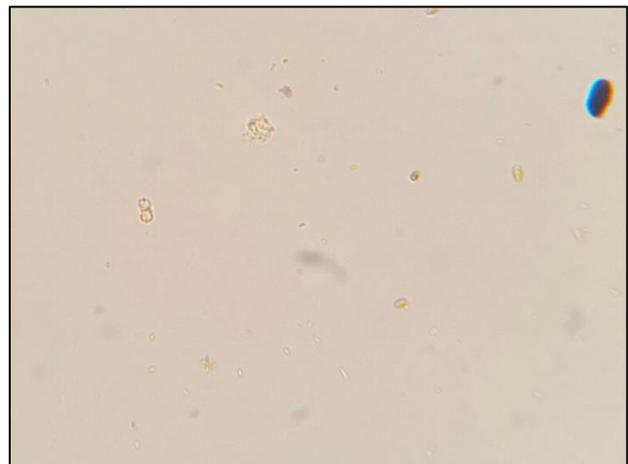


Foto 9. *Blastocystis spp.* granular. Muestra 139



Foto 10. *Blastocystis spp* granular. Muestra 140.

Se llevaron las muestras positivas de este segundo muestreo al Laboratorio de ecología del Hospital General Dr. Manuel Gea González para identificar *Blastocystis spp.* por medio de hacer PCR punto final y PCR punto final anidado. En ambos ensayos se obtuvieron resultados negativos ya que no se observaron las bandas de 479 pb que nos indica la presencia de *Blastocystis spp.*, dicha banda sólo se observó en el control positivo de la reacción. (Fotos 11-14).

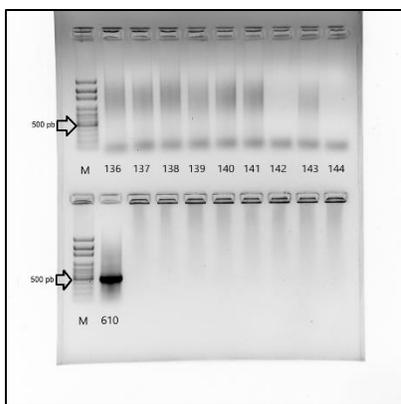


Foto 11. PCR punto final anidada (iniciadores externos e internos).

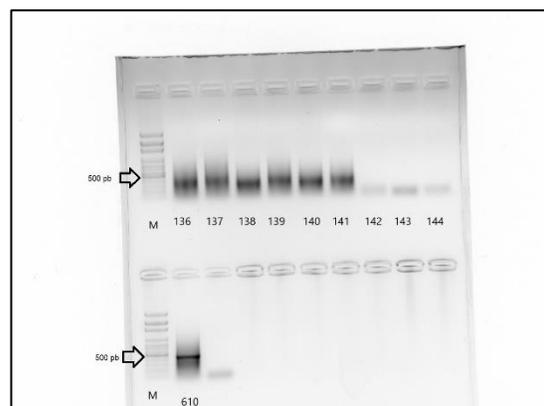


Foto 12. PCR punto final. Utilizando el método de Santin (iniciadores internos).

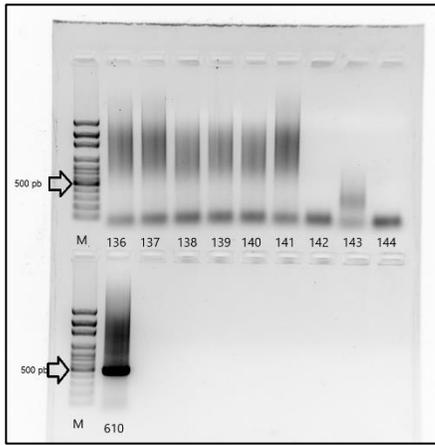


Foto 13. PCR punto final.  
Utilizando el método de Santin  
(iniciadores externos).

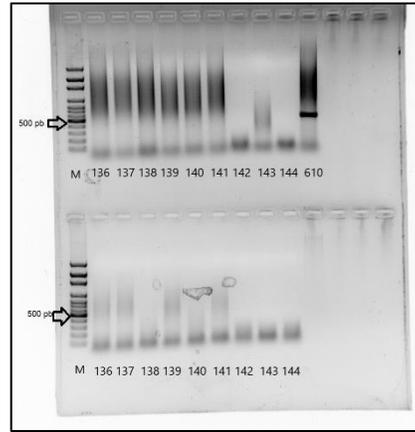


Foto 14. PCR punto final.  
Utilizando método de Santin  
(iniciadores externos) y  
Enhancer.

## 9. DISCUSIÓN

En la presente investigación, en el primer muestreo, se encontró el 45.18% de fresas contaminadas con parásitos intestinales humanos, como *Blastocystis spp*, *Entamoeba coli* y *Iodamoeba bustchlii* además de amebas y/o flagelados de vida libre, resultados similares fueron publicados en el Distrito Federal de Brasil, en donde 56% de las muestras de fresa analizadas tenían parásitos<sup>41</sup>. Para este caso encontramos similitudes con respecto a un tipo de parásito encontrado, que fue *Entamoeba coli*, además de que se reportaron amebas de vida libre no identificados como en nuestra investigación. Con respecto a los otros parásitos encontrados en dicha publicación<sup>41</sup> como son *Schistosoma mansoni*, *Ascaris lumbricoides*, *Balantidium coli*, *Endolimax nana*, *Entamoeba hartmanni*, que son parásitos intestinales que causan enfermedades desde moderadas a graves si no son tratadas a tiempo, podemos plantear que en México se cuentan con Normas Oficiales Mexicanas que regulan los límites permisibles de calidad y tratamiento que requiere el agua para su potabilización o Normas más enfocadas a los requisitos y especificaciones para la aplicación de buenas prácticas agrícolas en los procesos de producción de frutas y hortalizas frescas<sup>15,17</sup> y que esa es la razón por la cual no encontramos ninguna de estas especies en nuestro muestreo, así mismo, los helmintos reportados en esa investigación, son poco frecuentes (*A. lumbricoides*)<sup>42</sup> o bien inexistentes en nuestro medio (*S. mansoni*)<sup>43</sup>, por lo que su presencia en nuestro entorno sería muy rara. Respecto a los parásitos comensales reportados, si bien carecen de importancia clínica, tienen una importancia epidemiológica, pues es referente de la contaminación con materia fecal de los alimentos y del agua de consumo, siendo estos los mismos vehículos para la transmisión de otros protozoarios potencialmente patógenos<sup>44</sup>.

Con respecto a las amebas y/o flagelados de vida libre cuyas especies no fueron identificadas y que se visualizaron en el 20.74% de las fresas, se sabe que algunas amebas denominadas anfizoicas pueden causar enfermedades graves en el cerebro, tales como *Acanthamoeba spp*. que ocasiona la encefalitis granulomatosa, además de esto se ha demostrado que estas amebas de vida libre

son acarreadores de otros patógenos como *Campylobacter jejuni* causante de gastroenteritis humana en todo el mundo o *Legionella*, bacteria causante de un cuadro clínico con síntomas de neumonía que puede ir de leve-moderada, hasta enfermedad grave con fallo multiorgánico; que para estos dos casos se sabe que invaden a *Acanthamoeba spp*<sup>45,46</sup>.

Por otra parte, en relación al aspecto de la fruta con la presencia de parásitos en las fresas en la presente investigación, se encontró que en las muestras con *Blastocystis spp* y/o flagelados de vida libre el 45.5% tenían aspecto bueno. Para las muestras donde solo se visualizaron amebas y/o flagelados de vida libre el 21.4% de las fresas poseían buen aspecto. Se realizó un tratamiento estadístico en donde se calculó Chi cuadrada y se observó que no existe relación del aspecto de la fruta con la presencia de parásitos, ya que nos da un valor de  $X^2$  de 1.45 en las muestras donde hubo asociación de *Blastocystis spp* con amebas y/o flagelados de vida libre. En comparación con un estudio realizado en granjas donde se cultivaba fresa en Guanzhou, China<sup>39</sup>, en donde las fresas estaban con mal aspecto debido al forrajeo de la fauna silvestre, y observaron que las fresas que estaban mordidas o las que estaba más al exterior de la planta, contenían *Crypstosporidium spp*. Sin embargo, por el tipo de muestreo que realizamos en esta investigación no obtuvimos resultados con parásitos patógenos debido a que en los mercados aparentemente se tiene más cuidado con la fauna nociva.

Así mismo, para valorar la confiabilidad del examen coproparasitológico con las técnicas de lavado de solución salina isotónica y tween al 20% que utilizamos, y tomando como estándar de oro la Solución Salina Isotónica donde se recuperaron más muestras de fresas contaminadas con parásitos, realizamos cálculos de los valores de sensibilidad y especificidad, además de los valores predictivos positivos y negativos para validar el lavado de tween al 20%, obteniendo una sensibilidad del 10% y una especificidad del 98.7%, lo que nos orienta a decir que si tiene una buena especificidad, es decir, si puede servir como orientador para el diagnóstico de parásitos, sin embargo, no tiene una sensibilidad buena, ya que se identificaron pocas muestras positivas.

Por otra parte, después de someter las muestras positivas a la técnica de PCR, sin conseguir la amplificación del SSU ADNr del parásito *Blastocystis spp*, podemos pensar en varios factores que pudieron ocasionar el que no se hayan obtenido los resultados esperados; en primer lugar, es posible que haya habido interferencia de la pulpa de la fresa, ya que desde el momento en que comprobamos en el nano drop la pureza y contaminación de la muestra, obtuvimos resultados de absorbancias de A260/A280 menores de 1.8, que nos indican una muestra contaminada con proteínas o fenoles; además, para las absorbancias de A260/A230 obtuvimos una ratio menor de 1.5, indicativo que la muestra está contaminada con sales presentes en la solución, carbohidratos u otros contaminantes<sup>47</sup>. Para lograr la amplificación del SSU ADNr de *Blastocystis* en estudios futuros se podría extraer el ADN de la fracción del lavado previamente enriquecida por la técnica de Sheather o algún otro método de concentración, así se eliminarían los residuos de la pulpa de fresa.

El segundo punto a considerar, sería que las células de *Blastocystis spp* se hubiesen lisado, en algún momento del proceso o traslado de las muestras causando la degradación del DNA ya que las muestras sólo se mantuvieron en congelación sin algún preservador, y los requerimientos fundamentales deben ser que tenga un mínimo de copias intactas de una de las hebras de ADN que abarque la región a amplificar<sup>51</sup>, ya que como se menciona en el protocolo de extracción de ADN de Mónica Santín<sup>52</sup>, los primers utilizados para este protocolo e investigación pueden detectar hasta 0.0001 ng de ADN de *Blastocystis spp*.

El tercer punto a considerar, es el tipo de KIT que se utilizó para la purificación del ADN, el cual no es específico para purificación de ADN partiendo de una muestra de fruta, sino de muestras fecales<sup>53</sup>. Contrario a un estudio realizado en la Universidad de Querétaro para la detección de *Cyclospora cayetanensis* en bayas frescas, donde utilizaron un kit de extracción de DNA ZymoBIOMICS (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) que es específico para muestras de frutas<sup>54</sup>.

Por último, podemos considerar el hecho de que las estructuras observadas no hayan correspondido a *Blastocystis*, aunque el personal examinador de las mismas tiene más de 20 años de experiencia en el área.

## 10. CONCLUSIONES.

- Los resultados obtenidos en esta investigación nos permitieron conocer que las fresas que se venden en los mercados de Morelia están contaminadas con parásitos, obteniendo un 45.18% que equivale a 61 muestras analizadas de las 135 en total. Los parásitos encontrados fueron *Blastocystis spp.*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*.
- No hubo asociación del aspecto de la fruta con la presencia de parásitos para *Blastocystis spp.* y amebas y/o flagelado de vida libre
- La confiabilidad del examen coproparasitoscópico con el lavado tween 20 al 20%, nos da un valor de sensibilidad del 10 % y una especificidad del 98.7%.
- Los resultados de la PCR fueron negativos, ya que no se pudo amplificar el ADN del parásito *Blastocystis spp.*, aún con la utilización del medio de Cultivo de Jones, se obtuvieron resultados negativos.

Gracias a esta investigación, podemos decir que las fresas que a menudo son consumidas crudas por la población, sin lavar o desinfectar, están contaminadas con parásitos; además de que es indispensable contar con mejores infraestructuras en los mercados de Morelia, en donde los vendedores de las frutas y verduras tengan acceso a baños públicos limpios, con jabón y toallas desechables para un aseo de manos correcto y así evitar la contaminación de las frutas durante la manipulación de las mismas.

## **11. RECOMENDACIONES.**

- Lavar muy bien las fresas con agua y jabón antes de consumirlas. De ser necesario meterlas a congelación para preservar el aspecto de la fresa y con esto también asegurar que los parásitos que pudieran quedar pierdan su viabilidad.
- Como profesional de salud, promover el lavado de manos frecuente en establecidos donde se vende fruta de consumo crudo, sobre todo después de ir al baño, para evitar la contaminación fecal de las frutas.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández N. (2014). Generalidades de los parásitos. 2021, de Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Sitio web: [https://www.uaeh.edu.mx/docencia/VI\\_Lectura/bachillerato/documentos/2014/LECT109.pdf](https://www.uaeh.edu.mx/docencia/VI_Lectura/bachillerato/documentos/2014/LECT109.pdf)
2. Becerril MA. (2014). Parasitología Médica. México: McGraw-Hill. 4ª. Edición
3. Barriga O. Avances recientes en inmunología Parasitaria. DVM, PHD The Ohio State University, Columbus From Ohio, USA. [Internet]. Disponible en: [https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/parasitologia/v11\\_n1/pdf/a20v11n1.pdf](https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/parasitologia/v11_n1/pdf/a20v11n1.pdf)
4. Gutiérrez J, colabs. Respuesta Inmune a Virus y parásitos. Medigraphic [Internet] 2006 [consultado 2022 septiembre 08; 15(3) Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2006/al063d.pdf>
5. Tay J, Gutierrez M, Lara R y Velasco O. (2012). Parasitología Médica de Tay. México: Méndez Editores. 8ª. Edición.
6. Organización Mundial de la Salud. [Internet]. [consultado 2016 Agosto 20. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>.
7. Màrius Vicent Fuentes i Ferrer, María Estela Barceló. (2014). Parásitos en alimentos: Un problema de salud pública. 2021, de Universidad de Valencia. Sitio web: [https://www.researchgate.net/publication/258033306\\_Parasitos\\_en\\_alimentos\\_un\\_problema\\_en\\_salud\\_publica](https://www.researchgate.net/publication/258033306_Parasitos_en_alimentos_un_problema_en_salud_publica)
8. Betancourt, W. (2019). Cryptosporidium spp. En: J.B. Rose y B. Jiménez-Cisneros, (eds) Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project). (R. Fayer y W. Jakubowski (eds), Parte 3: Patógenos excretados específicos: aspectos ambientales y epidemiológicos - Sección 3: Protistas), Universidad Estatal de Michigan, E. Lansing, MI, UNESCO. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.33>

9. Chacin-Bonilla, L. (2017). Cyclospora Cayetanensis. En: J.B. Rose y B. Jiménez-Cisneros, (eds) Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project). (R. Fayer y W. Jakubowski (eds), Parte 3: Patógenos excretados específicos: aspectos ambientales y epidemiológicos - Sección 3: Protistas), Universidad Estatal de Michigan, E. Lansing, MI, UNESCO. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.32>
10. del Coco VF, et al. Blastocystis spp.: avances, controversias y desafíos futuros. Rev Argent Microbiol. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.08.004>
11. Supaluk, P. V. Adao, D. Rivera L.W. (2021). Infection, Genetics and Evolution; "Epidemiology and subtype distribution of Blastocystis in humans: A review. [Internet]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.meeqid.2021.105085>
12. Norma Oficial Mexicana 113. [Internet]. [consultado 2021 Julio 20] . Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>.
13. Norma Oficial Mexicana 111. [Internet]. [Consultado 20 Julio 2021]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/111ssa14.html>.
14. Norma Oficial Mexicana 127. [Internet]. [Consultado 20 Julio 2021]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/legislacion/mexico/nom-127-ssai.pdf>.
15. Norma Oficial Mexicana 127. [Internet]. [Consultado 20 Julio 2021]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html>.
16. Norma Oficial Mexicana 110. [Internet]. [Consultado 20 Julio 2021]. Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4883170&fecha=16/10/1995](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4883170&fecha=16/10/1995)
17. NOM-EM-034-FITO-2000. [Internet]. [Consultado 20 Julio 2021]. Disponible en: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/fito/fito034em.pdf>
18. Norma Oficial Mexicana 251. [Internet]. [Consultado 10 agosto 2021]. Disponible en: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/ssa1/ssa1251-10.pdf>

19. COFEPRIS [Internet]. Plan de Acción preventivo cilantro. [Consultado 15 Mayo 2022]. Disponible en: [PLANDEACCI\\_NCILANTRO.pdf \(www.gob.mx\)](#)
20. SAGARPA. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, “Fresa Mexicana”. [Internet]. México. Primer edición. 2017 [consultado 09 septiembre 2022] Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>
21. Plutzer J, PK. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. Water Research. 2016; 101(318-332).
22. Productos para desinfectar agua y alimentos. Revista Del Consumidor. 2001; 295(1-4).
23. Negroni M. Microbiología Estomatológica. 2nd ed. Buenos Aires: Panamericana; 2009.
24. Guía para uso de cloro en desinfección de frutas y hortalizas de consumo fresco. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. [Internet]. [Consultado 22 Julio 2021]. Disponible en: <https://www.oirsa.org/contenido/2020/Guia%20para%20uso%20de%20cloro%20co mo%20desinfectante%20en%20establecimientos%2023.06.2020.pdf>
25. Gaafar, M. R., El- Zawawy, L. A., El-Temshahy, M. M., Shalaby, T. I., & Hassan, A. Y. [Internet]. Silver nanoparticles as a therapeutic agent experimental cyclosporiasis. Experimental Parasitology. 2019 octubre 11 [Consultado 15 Mayo 2022] Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107772>
26. Boarato-David, E., Guimarães, S. y Cacciò, S. (2017). *Giardia duodenalis*. En: JB Rose y B. Jiménez-Cisneros (eds), Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project). (R. Fayer y W. Jakubowski (eds), Parte 3: Patógenos específicos excretados: Aspectos ambientales y epidemiológicos - Sección 3: Protistas), Universidad Estatal de Michigan, E. Lansing, MI, UNESCO. [consultado 15 mayo 2022] Disponible: <https://doi.org/10.14321 /aguapatógenos.35>

27. Global STD [Internet]. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA); 2017 noviembre 24 [Consultado 15 mayo 2022] Disponible en: [Enfermedades Transmitidas por Alimentos \(ETA\) - GlobalSTD](#)
28. OMS [Internet]. Enfermedades de Transmisión Alimentaria; [Consultado 15 mayo 2022] Disponible en: [Enfermedades de transmisión alimentaria \(who.int\)](#)
29. Instituto Nacional de Salud Pública. “Glosario epidemiológico”. [Internet]. [Consultado 29 mayo 2022]. Disponible en: <https://www.insp.mx/nuevo-coronavirus-2019/glosario-epidemiologico.html>
30. García Tapia A, Fernández Gutiérrez del Álamo C, López García C, García Martos P, Marín Casanova P. Brotes epidémicos de criptosporidiosis. Julio 2021, de Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz Sitio web:  
<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/Brotcripto.pdf>
31. Gallego LM , Heredia HL , Salazar JJ , Hernández TM, Naranjo MM, Suárez BL. Identificación de parásitos intestinales en agua de pozos profundos de cuatro municipios. Estado Aragua,Venezuela. 2011-2012. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2014; 66(2)(164-173).
32. Pino Santos A., Núñez Fernández FA., Martínez Sánchez R., Domenech Cañete I., Rodríguez M., Jerez Puebla L., et al. Prevalence and Risk Factors for Intestinal Parasitic Infections in a Rural Community in “Consolación del Sur” Municipality, Cuba. West Indian Med J. 2014; 63(4)(333).
33. Solomon Ngutor Karshima. Parasites of importance for human health on edible fruits and vegetables in Nigeria: a systematic review and meta-analysis of published data, Pathogens and Global Health, 2018; 112:1, 47-55, DOI: [10.1080/20477724.2018.1425604](https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1425604)

34. Taghipour A, Javanmard E, Haghighi A, Mirjalali H, Zali MR. The occurrence of *Cryptosporidium* sp., and eggs of soil-transmitted helminths in market vegetables in the north of Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2019;12(4):364-369).
35. Bekele F, Shumbej T. Fruit and vegetable contamination with medically important helminths and protozoans in Tarcha Town, Dawuro zone, South West Ethiopia. *Research and Reports in Tropical Medicine* 2019;10 19-23.
36. Dixon, B., Parrington, L., Cook, A., Pollari, F. & Farber, J. [Internet]. Detection of Cyclospora, Cryptosporidium and Giardia in ready- to- eat packaged leafy greens in Ontario, Canada. *Journal of Food Protection*, 76(2), 307-313. Disponible en: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-282>
37. Sim S, Won J, Kim J-W, Kim K, Park W-Y, Yu J-R. Simultaneous Molecular Detection of Cryptosporidium and Cyclospora from Raw Vegetables in Korea. *J. Parasitol* Vol.55 No 2:137-142, 201, DOI: <https://doi.org/10.3347/Kjp-2017.55.2.137>
38. Hernandez N, Pinto V, Muñoz Sánchez D, Lora-Suárez F, Gómez Marin JE. Detection of Giardia spp. with formalin/ether concentration in Brassica oleracea (cabbage) and Lactuca sativa (Lettuce). 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02377>.
39. Wei X, Hou S, Pan X, Xu C, Li J, Yu H, Chase J, Atwill ER, Li X, Chen K, Chen S. Microbiological contamination of Strawberries from U-Pick Farm in Guangzhou, China. *Int. J. Environ. Res. Salud Pública*, 2019, 16 (24) Online, disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijerph16244910>
40. Bartosova, B. Koudela, I. Slana. Detection of Cyclospora cayetanensis, Echinococcus multilocularis, Toxocara spp. and microsporidia in fresh produce using molecular methods: – A review, *Food and Waterborne Parasitology*, Volume 23, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2021.e00124>.
41. Morais da Silva, S. Regina, Rodrigues, M. Iriani, Alves Lima. Sónia, Silveria Mendes V., Ximendes Azevedo M. Lidiane., Gurgel-Goncalves R., Rodriguez

Camacho E. "Detection of intestinal parasites on field-grown strawberries in the Federal District of Brazil". *Revista Sociedad Brasileira de Medicina Tropical*, 2014. Online: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0044-2014>

42. SUIVE, DGE, Secretaría de Salud [Internet]. Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por mes de notificación; 2020 [Consultado 15 mayo 2022]. Disponible en: [https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2020/morbilidad/nacional/veinte\\_principales\\_causas\\_enfermedad\\_nacional\\_mes.pdf](https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2020/morbilidad/nacional/veinte_principales_causas_enfermedad_nacional_mes.pdf)

43. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. Schistosomiasis; 2019 agosto 14 [consultado 14 mayo 2022]. Disponible en: [CDC - DPDx - Schistosomiasis Infection](https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis-infection/)

44. Agudelo, S., Gómez, L., Coronado, X., Orozco, A., Valencia, C., Restrepo, L., Galvis, L., Botero, L., [Internet]. "Prevalence of intestinal parasitism and associated factors in a village on the Colombian Atlantic Coast". 2008 [Consultado 15 mayo 2022]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rsap/v10n4/v10n4a13.pdf>

45. Olofsson, J., Axelsson-Olsson, D., Brudin, L., Olsen, B., & Ellström, P. (2013). *Campylobacter jejuni* actively invades the amoeba *Acanthamoeba polyphaga* and survives within non digestive vacuoles. *PloS one*, 8(11), e78873. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078873>

46. Magnet, A., Peralta, R. H., Gomes, T. S., Izquierdo, F., Fernandez-Vadillo, C., Galvan, A. L., Pozuelo, M. J., Pelaz, C., Fenoy, S., & Del Águila, C. (2015). Vectorial role of *Acanthamoeba* in *Legionella* propagation in water for human use. *The Science of the total environment*, 505, 889–895. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.064>

47. Orfao, A. "colaboradores".(2011). Protocolo de extracción de ácidos nucleicos. En línea. Recuperado 2022, de: <https://redbiobancos.es/wp-content/uploads/pnt-extraccion-acidos-nucleicos.pdf>

48. Serrato A, Flores LI, Aportela J, Sierra E. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. 2022, de Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

(Semarnat) Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I) Sitio web: [https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4\\_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)

49. Puig Y, Carrera V. J, Leyva C. V, Hernández C. I. Establecimiento de una técnica para la determinación de enteroparásitos en vegetales mediante inmunofluorescencia. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 2011; 49(1)(24-32).

50. Orozco M. G. Manual de procedimientos de parasitología. Laboratorio de Investigación de Microbiología y Parasitología. Hospital Infantil Eva Sámano de López Mateos.

51. R. Green M, Sambrook J. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. 2012 Cold Spring Harbor Laboratory Press.

52. Santín M, Gómez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. *Development of a new PCR protocol to detect and subtype Blastocystis spp. from humans and animals*. *Parasitol Res*. 2011; 109: 205–212.

53. DNeasy Blood & Tissue Handbook. (2020). QuiaGen. Recuperado en marzo 2022. En línea: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit/>

54. Resendiz-Nava CN, Orozco-Mosqueda GE, Mercado-Silva EM, Flores-Robles S, Silva-Rojas HV, Nava GM. A Molecular Tool for Rapid Detection and Traceability of *Cyclospora cayetanensis* in Fresh Berries and Berry Farm Soils. *Foods*. 2020;9(3):261. Published 2020 Mar 2. doi:10.3390/foods9030261

55. Zaman et al., 1994. Una comparación de microscopia directa con cultivo para el diagnóstico de *Blastocystis hominis*. *Revista del Sudeste Asiático de Medicina Tropical e Higiene*, 25: 792-793.

Leelayoova, S., et al. 2002. Cultivo in vitro: un método sensible para detectar *Blastocystis hominis*. *Anales de Medicina Tropical y Parasitología*, 96: 803-807.

56. Gómez González, C., Pérez Castán, JF., [Internet] "Introduction course to clinical research. Chapter 8 : Diagnostic tests. 2007 [consultado 2022 mayo 15] Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-familia-semergen-40-articulo-curso-introduccion-investigacion-clinica-capitulo-13113212>

## **13. ANEXOS**

### **ANEXO 1. LAVADO DE LAS FRUTAS CON SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA**

#### **MATERIAL**

-Bolsa de plástico nueva

-Pipeta estéril

-Propipeta

#### **REACTIVOS**

-Solución Salina Isotónica al 10%

#### **EQUIPO**

-Centrífuga

#### **PROCEDIMIENTO**

- 1.- Colocar la mitad de la fresa en una bolsa de plástico nueva
- 2.- Agregar 15 ml de solución salina isotónica estéril
- 3.-Lavar el contenido de la bolsa por fricción para desprender las formas parasitarias, procurando no destruir la fruta.
- 4.- Dejar reposar durante una dos horas<sup>49</sup>.

## **ANEXO 2.**

### **SOLUCIÓN DE LAVADO CON TWEEN 20.**

#### **MATERIAL:**

-Pinzas estériles

-Bolsa de plástico

-Pipeta estéril.

## **REACTIVOS**

-Tween 20

## **EQUIPO**

-Centrífuga

## **PROCEDIMIENTO**

- 1.-Depositar la mitad de la fresa en una bolsa de plástico y agregar 15 ml de Tween 20 al 20%,
- 2.- Lavar suavemente por ambas caras durante 2-3 minutos por fricción.
- 3.- El líquido resultante del lavado se deja sedimentar en reposo a temperatura ambiente por 2-3 horas.
- 4.- Centrifugar a 331 de fuerza centrífuga relativa (FCR) x g durante 3-5 minutos.
- 5.- Recolectar el sedimento<sup>49</sup>.

## **ANEXO 3.**

### **EXAMEN DIRECTO EN FRESCO**

Es una técnica para detectar la presencia y movilidad de trofozoítos de protozoarios, así como, quistes y ooquistes de los mismos, formas de *Blastocystis spp.*, así como huevos y larvas de nematodos.

### **MATERIAL**

- Porta objetos 7.5 X 2.5 cm
- Cubre objetos 22 X 22 mm
- Aplicadores de madera
- Hisopos
- Pipeta Pasteur con bulbo de goma
- Parafina- vaselina 1:1

## **REACTIVOS**

-Solución salina isotónica 0.85% (ssi)

-Solución yodo-lugol

-Frasco con cloro para descartar el material.

## **EQUIPO**

-Microscopio compuesto

-Parrilla eléctrica para derretir la parafina

## **PROCEDIMIENTO**

1. Colocar 1 gota de solución salina isotónica ó yodo Lugol en el centro del portaobjetos.

2. Con el aplicador de madera, tomar la muestra, calculando más o menos 1.5 a 2 mg. de heces y hacer una suspensión uniforme con la gota de SSI o Yodo-Lugol

3. Cubrir la preparación con el cubreobjetos

4. Con un hisopo limpiar las orillas del cubre objetos para quitar el exceso de muestra.

5. Sellar la preparación con parafina

6. Observar al microscopio con objetivos 10X y 40X<sup>50</sup>.

## **ANEXO 4.**

### **TÉCNICA DE SHEATHER.**

Esta técnica nos ayuda a Identificar las formas parasitarias de tamaño pequeño (ooquistes de *Cryptosporidium* y *Cyclospora*). Se utiliza una solución concentrada de sacarosa la cual posee una densidad de 1.20, lo que permite la flotación de parásitos menos densos.

### **Material:**

Agua destilada 320 ml.

Tubos de ensaye 13X100.

Portaobjetos desengrasados de 26X76 mm.

Cubreobjetos de 22X22 mm.

Varilla de vidrio.

Pizeta con agua.

Vaso de plástico de 100 ml.

Embudos de plástico de 5 cm de diámetro.

Gasa en cuadros de 16X16 cm.

Abatelenguas de madera.

Aplicadores de madera.

Hisopos.

Asa bacteriológica con aro de 5mm de diámetro doblada con un ángulo de 90°.

Gradilla.

Parafina-vaselina 1:1.

Solución parafina-vaselina 1:1.

**Reactivos:**

Solución de Sheather densidad 1.180-1.200.

Solución de yodo-lugol.

Cloro al 10% para descartar el material.

**Equipo:**

Microscopio compuesto

Parrilla eléctrica

Centrifuga

Densímetro

**Procedimiento:**

1. Filtrar de 1 a 2 ml de heces con gasa en un tubo de centrifuga.
2. Lavar con agua de la canilla o agua destilada por centrifugación hasta sobrenadante limpio.
3. Agregar al sedimento la solución de Sheather hasta el borde del tubo.
4. Mezclar suavemente con varilla de vidrio.
5. Dejar reposar 3 minutos o centrifugar 1 minuto a 1500rpm.
6. Retirar 1 o 2 gotas de la película superficial con asa de alambre.
7. En un porta objetos colocar una gota de yodo-lugol, y homogeneizar con el cubreobjetos.
8. Con un hisopo limpiar el exceso de muestra alrededor del cubreobjetos.
9. Sellar la preparación con parafina.
10. Observar al microscopio, primeramente, utilizando el objeto de 10x y posteriormente con el objetivo de mediana resolución para confirmar las estructuras de los quistes<sup>50</sup>.

**ANEXO 5.****FORMOL/ÉTER MODIFICADO**

El método se basa en la descripción previa de las muestras de heces humanas y aguas residuales.

**Material:**

Tubos cónicos para centrifuga, de 15 ml.

Vaso de plástico de 100 ml

Pipetas Pasteur

Bulbos de goma.

Porta objetos de 38 X 76 mm.

Cubre objetos 22 X 22 mm.

Tapones de hule

Pizeta con agua

Embudos de plástico de 5 cm de diámetro

Hisopos

Gradilla

Parafina-vaselina 1:1

**Reactivos:**

Solución de yodo-lugol.

Solución de formol al 10%.

Éter.

Cloro como desinfectante al 10%.

Cloruro sódico 0,85%

**Equipo:**

Microscopio compuesto.

Parrilla.

Centrífuga.

Vortex.

**PROCEDIMIENTO:**

1. Se realizará una modificación, se tomarán 250 ml de volumen del agente de lavado, y se dejará reposar con el vegetal en el recipiente por un día, a continuación, se tomará una alícuota del sedimento para continuar con el proceso.

2. Tomar una alícuota de 10 ml del sedimento, centrifugar cada una durante 5 min a 1600 g a 4 ° C en una centrífuga.
3. Descartar el sobrenadante de cada tubo y agitar con vórtex.
4. Completar el sedimento hasta 5 ml con solución salina. Añadir 5 ml de solución de formalina al 10% y 3 ml de éter etílico.
5. Sellar rigurosamente y agitar en vortex el tubo para llevar el éter etílico en contacto con todas las partes del sedimento.
6. Realizar una nueva centrifugación a 1.000 g durante 2 min.
7. Después de formadas que cuatro capas diferentes, como sigue:

sedimento en la parte inferior

solución salina

restos de agua

éter de dietilo en la parte superior.

Decantar las tres capas superiores de modo que sólo el sedimento se mantenga en el tubo.

8. Re suspender está capa en unos 100 microlitros de solución de cloruro sódico al 0,85% y posteriormente poner en portaobjetos para observar<sup>50</sup>.

## **ANEXO 6. MEDICIÓN MICROSCÓPICA DE PARÁSITOS Y SUS PRODUCTOS.**

La medición de los parásitos y sus productos es un recurso valioso para precisar el tamaño de los huevos y de los parásitos en sus estadios de su evolución y permite una mejor diferenciación de ellos y un adecuado diagnóstico. Se puede realizar con un micrómetro ocular u ocular micrométrico y el micrómetro objetivo.

Principio: Los micrómetros oculares están grabados con una escala fija que consiste en 50 líneas paralelas. Cada división del micrómetro ocular representa diferentes medidas según el poder de resolución del juego de objetivos utilizados

en un microscopio compuesto, por lo tanto, para cada juego de oculares y objetivos utilizados, la escala ocular se debe comparar con una escala calibrada conocida. Es importante recordar que una vez efectuada la calibración con un determinado juego de oculares y objetivos, éstos no pueden ser intercambiados con los componentes correspondientes de otro microscopio

**Coefficiente micrométrico:** Es una cifra que expresa la equivalencia en micras de una división de la escala del micrómetro ocular al emplear cada objetivo del microscopio. Suele denominarse “factor” y la operación para obtenerlo “calibración del microscopio”. El coeficiente micrométrico es inversamente proporcional al poder de amplificación de los objetivos utilizados. Habitualmente se obtienen 3 coeficientes micrométricos para cada microscopio usando un solo ocular micrométrico y los objetivos 10X y 45X (seco débil y seco fuerte) y de 90X o 100X (de inmersión), pero puede hacerse cualquier combinación de ocular y objetivo. Para obtener el coeficiente micrométrico hay que seguir la siguiente técnica.

**MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO:**

-Micrómetro ocular de escala fija. Es un pequeño disco de vidrio de 12 mm de diámetro, en el cual puede verse grabada una escala de mm, dividida en 50 partes y generalmente numerada de 10 en 10. Este disco se coloca sobre el diafragma de cualquier ocular, transformándolo así en ocular micrométrico. Cada división de esta escala mide 100 um.

-Ocular micrómetro de platina con divisiones de 0.1 y 0.01 mm. Es esencialmente similar al micrómetro, pero la lente va montada sobre un corto tubo que puede acortarse o alargarse a voluntad por deslizamiento en el tubo externo, permitiendo así enfocar con toda precisión la escala micrométrica intercalada en él.

Micrómetro objetivo. Es un portaobjetos en cuyo centro se halla grabada una escala de 1 o 2 mm, dividida en 100 o 200 partes, cada división mide 10 um.

Microscopio compuesto estándar.

## PROCEDIMIENTO:

- 1.-Retirar el ocular del microscopio. Si se utiliza un microscopio binocular, se acostumbra a retirar el ocular X10 derecho.
- 2.-Desenroscar la lente superior del ocular e insertar la oblea del micrómetro de modo que se apoye en el anillo del diafragma dentro del ocular. Colocar el micrómetro con el lado grabado hacia abajo. El micrómetro se manipula con paño para lentes y se debe evitar por todos los medios que algún hilo quede adherido a la superficie.
- 3.-Reinsertar el ocular. Al observar a través del ocular, la escala del micrómetro aparece como una serie de divisiones alineadas.
- 4.-Colocar el micrómetro de platina bajo el objetivo del microscopio que se ha de calibrar. Enfocar la escala del micrómetro de platina que se ve como una serie de divisiones de 0.1 y 0.01 mm.
- 5.-Ajustar el micrómetro de platina de modo que la línea "0" de la escala del micrómetro ocular se superponga exactamente con la línea "0" de la escala del micrómetro de platina.
- 6.-Sin efectuar ninguna otra manipulación, observar ambas escalas y hallar el próximo par de líneas que coincidan exactamente.

## CÁLCULOS

El objeto de la calibración es determinar cuánto mide en um cada división de la escala ocular cuando se calibra contra la escala del micrómetro objetivo. Por ejemplo, si 40 unidades de la escala ocular equivalen a 0.09 mm de la escala del micrómetro de la platina y cada división del ocular es igual a  $0.09 \text{ mm}/40$ , o sea 0.00225 mm. Dado que hay 1000 um en cada milímetro, cada división del micrómetro ocular en la calibración ilustrada es igual a  $0.00225 \times 1000$  o sea 2.25 um. Este mismo cálculo sirve para calibrar cualquier juego de oculares y objetivos, sustituyendo los números adecuados<sup>50</sup>.

## ANEXO 7. EXTRACCIÓN DE ADN

### Extracción por Fenol-Cloroformo

Se realiza la siguiente preparación de soluciones:

Soluciones	Vol. Para 1 ml de muestra	Vol. Para 43 muestras
Tris-Cl pH 8	50µl	2,150µl
EDTA 0.5 M pH 8	100µl	4,300µl
NaCl 1M	50µl	2,150µl
SDS 10x (Detergente)	100µl	4,300µl

Ya realizado la preparación de las soluciones, se procedió a centrifugar las muestras con el lavado de la solución salina. En un ciclo 14,000 rpm durante veinte minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de centrifugado se separaron de la siguiente manera:

700 µl de precipitado

550µl de sobrenadante

- 1) Realizar coctel con las soluciones de arriba y añadir 20 µl de Proteinasa K multiplicados por el número de muestras de fresa, que fueron 43.
- 2) Añadir a cada muestra de fresa 320 µl del coctel.
- 3) Resuspender el sedimento
- 4) Colocar en baño María a 55 °C toda la noche.
- 5) Pasado el tiempo en baño María durante toda la noche, agregar 500µl de Fenol equilibrado (con 0.5M de tris con pH 8 y mezclar suavemente).
- 6) Centrifugar a 14,000 rpm durante 10 minutos.
- 7) Tomar de la fase acuosa y pasar a otro tubo.
- 8) Agregar a la fase acuosa 500 µl de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1. Se homogeniza en el vortex. Tomar de la parte de abajo del tubo.
- 9) Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos.
- 10) Recuperar la fase acuosa, ponerla en tubo nuevo
- 11) Agregar 500µl de cloroformo y homogenizar en vortex

- 12) Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos
- 13) Recuperar la fase acuosa y agregar 500µl de Isopropanol más 10 % de acetato de NaCl 5M (en relación al volumen sin etanol)
- 14) Incubar toda la noche a -20 °C ó una hora a -70°C
- 15) Centrifugar a 14,000 rpm durante 20-30 minutos.
- 16) Decantar
- 17) Lavar con 1 ml de Etanol al 70%
- 18) Centrifugar a 14,000 rpm por 15 minutos.
- 19) Secar y resuspender en 22 µl de TE.

El ADN está ahora viable para utilizarse en PCR y en otras aplicaciones<sup>51</sup>.

### PCR PUNTO FINAL CON INICIADORES SANTIN

Para la amplificación del SSU rDNA de *Blastocystis* se utilizaron los primers diseñados por Santin et al. 2011 que son: *Primer Forward Blast* 505–532 (5' GGA GGT AGT GAC AAT AAATC 3'), *Primer Backward Blast* 998–1017 (5' TGC TTT CGC ACT TGT TCATC 3'). La amplificación del fragmento es de 479 bp, conteniendo una región variable que permite subtipificar los especímenes de *Blastocystis*. La localización de los primers en referencia a la secuencia de nucleótidos U51151 son a nucleótidos positivos 445–464 y 905–924.

Cada reacción se llevó a un volumen total de 25 µl, conteniendo la siguiente mezcla:

Soluciones	Volumen total para una reacción	Volumen total para 25 muestras	Concentración final de Reactivo
Buffer de PCR 10X	2.5 µl	62.5 µl	1X
DNTPS 10X	2.5 µl	62.5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0.75 µl	18.75 µl	1.5mM
Albumina 1%	1.0 µl	25 µl	0.04%
Oligo F (505) 25 µM	1.0 µl	25 µl	1µM
Oligo R (998) 25 µM	1.0 µl	25 µl	1µM
DNA ó Producto de PCR	-	-	-
Taq DNA polimerasa	0.3 µl	6.6 µl	

5U/μL		
H <sub>2</sub> O	13.95 μl	348.75 μl

Se hizo la primer PCR punto final con un total de veinticinco muestras. Veinte de las muestras de las fresas, uno para el control y tres de cepas ATCC de *Blastocystis spp*

Un total de 35 ciclos, cada ciclo consistió en 95°C por 30 segundos de desnaturalización, 54°C por 30 segundos para el alineamiento, y 72°C por 30 segundos para la elongación, con previo calentamiento a 95°C por 5 minutos, una extensión final a 72°C por 10 minutos. Se utilizará un termociclador Axygen.

El producto obtenido se analizó en gel de agarosa-TAE al 1.5% teñido con bromuro de etidio (1 μl/10ml TAE), para este caso se pusieron 4 μl de bromuro de etidio, ya que el gel de agarosa que se preparó, se medió 40 ml de TAE. Cargar el gel de agarosa con 10 μl de producto de PCR con aproximadamente 2 μl de Buffer de carga.

Correr el gel de agarosa por 30 minutos aproximadamente a 90 Volts, para después observarlo bajo luz UV en foto documentador Care Stream<sup>52</sup>.

PCR punto final anidada. La PCR punto final anidada involucra dos reacciones consecutivas de amplificación. La primera reacción se realiza con iniciadores externos en este caso con iniciadores 18S-1 y la segunda reacción se realiza con iniciadores internos (en este caso los diseñados por Santin)<sup>52</sup> y consiste en emplear el producto de PCR de la primera reacción con el segundo par de iniciadores.

Secuencia de los Oligos o iniciadores utilizados en la reacción 1.

18S-1-F 18S Ribosomal nuclear

GCTTATCTGGTTGATCCTGCCAGTAGT

18S-1-R 18S Ribosomal nuclear

TGATCCTTCCGCAGGTTCCACCATA

## Preparación del coctail de la reacción 1

Soluciones	Volumen total para una reacción	Volumen total para 25 muestras	Concentración final del Reactivo
Buffer de PCR 10X	2.5 µl	62.5 µl	1X
DNTPS 10X	2.5 µl	62.5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> 5mM	2.0 µl	50.0 µl	1.5mM
Albumina 1%	1.0 µl	25 µl	0.04%
Oligo F 18S	0.5 µl	12.5 µl	0.5µM
Oligo R 18S	0.5 µl	12.5 µl	0.5µM
DNA ó Producto de PCR	-	-	-
Taq DNA polimerasa 5U/µL	0.3 µl	7.5µl	
H <sub>2</sub> O	5.7 µl	142.5 µl	

El ciclo para la PCR punto final con iniciadores 18S-1 externos es diferente al de Santin, a continuación, se muestra el ciclo para este:

Un total de 40 ciclos, cada ciclo consistió en 94°C por 30 segundos de desnaturalización, 57°C por 1.30 minutos para el alineamiento, y 57°C por 1.30 minutos para la elongación, con previo calentamiento a 94°C por 5 minutos, una extensión final a 72°C por 10 minutos. Se utilizó un termociclador Axygen.

La reacción 2, o reamplificación con los iniciadores internos se realizó como se indica en los párrafos previos (PCR punto final con Iniciadores Santin).

Para el segundo muestreo se hizo la extracción de DNA usando un Kit de extracción de nombre DNeasy Blood & Tissue Kit de la marca QuiaGen siguiendo el protocolo del fabricante:

- 1) Centrifugar la muestra a un máximo de  $5 \times 10^6$  células por 5 minutos a 300 x g (190rpm). Resuspender en 200 µl de PBS. Adicionar 20 µl de proteinasa K. Proceder al paso 2
- 2) Adicionar 200 µl de buffer AL. Mezclar minuciosamente en vortex.
- 3) Adicionar 200 µl de etanol (96-100%). Mezclar minuciosamente en vortex.

- 4) Pipetear la mezcla en una columna de DNeasy mini spin colocada en un tubo de colección de 2 ml. Centrifugar a  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm) por un minuto. Desechar el tubo de paso y de recolección.
- 5) Colocar la columna spin en un nuevo tubo de recolección de 2 ml. Adicionar 500  $\mu\text{l}$  de Buffer AW1. Centrifugar por un minuto a  $\geq 6000 \times g$ . Desechar el tubo de paso y de recolección.
- 6) Colocar la columna spin en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, adicionar 500  $\mu\text{l}$  de Buffer AW2, centrifugar por 3 minutos a  $20,000 \times g$  (14,000 rpm). Desechar el tubo de paso y de recolección.
- 7) Transferir la columna spin en un nuevo microtubo de 1.5 o 2 ml.
- 8) Eluir el DNA adicionando 200  $\mu\text{l}$  de Buffer AE en el centro de la membrana de la columna spin. Incubar por 1 minuto a una temperatura de 15-25°C. centrifugar por 1 minuto a  $\geq 6000 \times g$ <sup>53</sup>.

#### **ANEXO 8. MEDIO DE CULTIVO DE JONES**

El medio de cultivo de Jones es el medio más efectivo para *Blastocystis spp.* Es uno de los medios de cultivo in vitro que no requiere tantas exigencias en la preparación y en la conservación del mismo. La preparación del medio de cultivo es la siguiente:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 9.46\text{g}$  en 1 L de agua destilada

$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 9,08\text{ g}$  en 1 L de agua destilada

$\text{NaCl} = 9,00\text{ g}$  en 1 L de agua destilada

1. Mezclar 93,8 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  con 31,3 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 562,5 ml de NaCl.
2. A la solución tamponada, agregar extracto de levadura (Oxoid) al 1%
3. Esterilizar en autoclave a 15 lb pulgada<sup>-2</sup> durante 15 minutos.
4. Antes de usar, agregar suero de caballo al 10% (inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos al medio de Jones).

El cultivo se incuba durante 48-72 horas. (Nota: la presencia de bacterias en la muestra será suficiente para crear el entorno anaeróbico necesario para que crezca *Blastocystis*<sup>55</sup>.

Inoculación del medio de cultivo:

1. Poner las 20 fresas enteras en una bolsa de plástico nueva
2. Agregar 30 ml de Solución Salina Isotónica y proceder a hacer el lavado (Anexo 1)
3. Agitar el contenido de la bolsa procurando desprender las formas parasitarias, sin destruir la fruta.
4. Tomar 15 ml para medio de cultivo (Anexo 10) y 15 ml para las demás técnicas coproparasitológicas.
5. Centrifugar los 15 ml de lavado a 3000 rpm durante 15 minutos.
6. Decantar el sobrenadante
7. Recuperar el sedimento y Re suspender con unas gotas de medio de cultivo de Jones
8. Tomar con una pipeta calibrada 500 µl del sedimento
9. Suspender el sedimento en el medio de cultivo
10. Incubar el medio de cultivo a 37°C durante 96 horas. Revisar a las 24, 72 y a las 96 horas en microscopio<sup>55</sup>.

#### **ANEXO 9. CALCULOS SOBRE LA ASOCIACIÓN DEL ASPECTO DE LA FRUTA CON LA PRESENCIA DE PARÁSITOS EN FRESAS.**

Estos cálculos se hicieron con Chi cuadrada<sup>56</sup>.

Donde:

$X^2 = 3.84$

$P = 0.05$

$gl = 2$

$$X^2 = \frac{\sum (V_o - V_e)^2}{V_e}$$

$$a = \frac{(a+c)(a+b)}{a+b+c+d}$$

$$b = \frac{(b+d)(a+b)}{a+b+c+d}$$

$$c = \frac{(a+c)(c+d)}{a+b+c+d}$$

$$d = \frac{(b+d)(c+d)}{a+b+c+d}$$

	NEG	BLAS Y/O FVL/AVL	
BUENO	a	b	a+b
MALO/ DETE RIORA DO	c	d	c+d
	a+c	b+d	a+b+c+d

	NEG	BLAS Y/O FVL/AVL	
BUENO	43	15	58
MALO/ DETE RIORA DO	31	18	49
	74	33	107

Tabla de cálculos de muestras con *Blastocystis spp*, flagelados y/o Amebas de vida libre

$$a = \frac{(74)(58)}{107} = 40.11$$

$$b = \frac{(33)(58)}{107} = 17.88$$

$$c = \frac{(74)(49)}{107} = 33.88$$

$$d = \frac{(33)(49)}{107} = 15.11$$

$$X^2 = \frac{(43-40.11)^2}{40.11} + \frac{(15-17.88)^2}{17.88} + \frac{(31-33.88)^2}{33.88} + \frac{(18-15.11)^2}{15.11} =$$

$$X^2 = 0.20 + 0.46 + 0.24 + 0.55 = \underline{\underline{1.45}}$$

Tabla de muestras con Amebas y/o flagelados de vida libre

	NEG	AVL/FVL	
BUENO	43	06	49
MALO/ DETE RIORA DO	31	22	53
	74	28	102

$$a = \frac{(74)(49)}{102} = 35.54$$

$$b = \frac{(28)(49)}{102} = 13.45$$

$$c = \frac{(74)(53)}{102} = 38.45$$

$$d = \frac{(28)(53)}{102} = 14.54$$

$$X^2 = \frac{(43-35.54)^2}{35.54} + \frac{(06-13.45)^2}{13.45} + \frac{(31-38.45)^2}{38.45} + \frac{(22-14.54)^2}{14.54} =$$

$$X^2 = 1.56 + 4.12 + 1.44 + 3.82 = \underline{\underline{10.94}}$$

**ANEXO 10. CALCULOS PARA VALORAR LA CONFIABILIDAD DEL EXAMEN COPRAPASITOSCOPICO Y DEL LAVADO DE TWEEN AL 20% Y DE LA SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA<sup>56</sup>.**

	BLAS	NEG	
(+)	VP	FP	a+b
(-)	FN	VN	c+d
	a+c	b+d	a+b+c+d

$$S = a/a+c$$

$$VP/VP+FN$$

$$E = d/b+d$$

$$VN/VN+FP$$

$$VPP = a/a+b$$

$$VP/VP+FP$$

$$VPN = d/c+d$$

$$VN/VN+FN$$

Tabla para valorar la sensibilidad del lavado con Tween al 20%

	BLAS	NEG	
Tween (+)	3	1	4
Tween (-)	27	75	102
	30	76	106

$$S = 3/30 = 10\%$$

$$E = 75/76 = 98.7\%$$

$$VPP = 3/4 = 75\%$$

$$VPN = 75/102 = 73.5\%$$