DETECCIÓN MOLECULAR DE *Giardia duodenalis*, *Blastocystis* spp. *Toxoplasma gondii* y *Cryptosporidium* spp. EN FRUTAS Y HORTALIZAS COMERCIALIZADAS EN LA CIUDAD DE IBAGUÉ

LAURA ALEJANDRA OSORIO DELGADO

Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de Biólogo

Director
GUSTAVO ADOLFO VALLEJO
Lic. Biología y Química M.Sc., Ph.D.

Codirector:
JULIO CESAR CARRANZA MARTÍNEZ
Lic. Biología y Química M.Sc., Ph.D.

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
IBAGUÉ – TOLIMA
2019

PROGRAMA DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO: **DETECCIÓN MOLECULAR DE Giardia duodenalis, Blastocystis spp. Toxoplasma gondii y Cryptosporidium spp. EN FRUTAS Y HORTALIZAS COMERCIALIZADAS EN LA CIUDAD DE IBAGUÉ**

AUTORES: **Laura Alejandra Osorio Delgado (0701)**

DIRECTOR **GUSTAVO ADOLFO VALLEJO**
Julio Cesar Carranza

JURADOS **Victoria Eugenia Rodriguez (Universidad del Tolima)**
Isaura Pilar Sánchez (Universidad Remington)

CALIFICACIÓN 4.91

X APROBADO ___REPROBADO

OBSERVACIONES

FIRMAS

Victoria Rodriguez
JURADO 1.

Isaura Pilar Sánchez
JURADO 2.

Director del trabajo

Director del Programa (Ad hoc)

Ciudad y fecha: Ibagué, 23 de Enero de 2020

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermano, por su completo apoyo moral y económico en todo mi proceso de formación académica y personal.

Al Doctor Gustavo Vallejo, por abrirme las puertas del laboratorio, dirigir mis ideas de proyecto y ser el ejemplo de transparencia, integridad, constancia, tenacidad y amor a la ciencia.

Al Doctor Julio Cesar Carranza, por su orientación académica, oportunas correcciones y ser modelo de responsabilidad y disciplina.

A Jazmín Suarez y Daniel Zabala por su cariño, acompañamiento y ser el reflejo de entrega, paciencia y fortaleza frente a la academia y la vida.

A todos mis amigos integrantes del LIPT, que me han regalado momentos imborrables, apoyo y compañía que me hacen crecer y vivir agradecida de lo que soy y lo que me rodea.

A mis amigos de carrera, por cada espacio y momento compartido.

A Dios, el mas importante, por mi vida y por hacerme el ser del cual me siento afortunada todos los días.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. OBJETIVOS	16
1.1. OBJETIVO GENERAL	16
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	17
2.1. PARÁSITOS EN FRUTAS Y HORTALIZAS	17
2.2. *GIARDIA DUODENALIS*	22
2.3. *BLASTOCYSTIS* SPP	28
2.4. *TOXOPLASMA GONDII*	42
2.5. *CRYPTOSPORIDIUM* SPP	43
3. METODOLOGÍA	46
3.1. ÁREA DE ESTUDIO	46
3.2. SELECCIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO	47
3.3. CONTROLES POSITIVOS	48
3.4. CONCENTRACIÓN DE QUISTES	49
3.5. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	50
3.6. DETECCIÓN MOLECULAR	51
3.7. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	52
4. RESULTADOS	59
4.1. ESTANDARIZACIÓN DE METODOLOGÍAS	59
4.2. DETECCIÓN MOLECULAR EN HORTALIZAS	60
4.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR (*Blastocystis* y *Giardia duodenalis)*	63
4.4. POLIPARASITISMO	65

5. DISCUSIÓN 66
5.1. CONCENTRACIÓN A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL 66
5.2. DETECCIÓN MOLECULAR EN HORTALIZAS 67

6. CONCLUSIONES 76

RECOMENDACIONES 77

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 78

ANEXOS 99

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Prevalencia de protozoos patógenos intestinales en Colombia	21
Figura 2.	Estados morfológicos de *Giardia duodenalis*	23
Figura 3.	Ciclo de vida de *Giardia duodenalis*	24
Figura 4.	*Blastocystis* spp forma vacuolar	28
Figura 5.	Estados morfológicos de *Blastocystis* spp	29
Figura 6.	Ciclo de vida de *Blastocystis* spp	32
Figura 7.	Formas de *Toxoplasma gondii*	36
Figura 8.	Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*	40
Figura 9.	Morfología de *Cryptosporidium* spp	45
Figura 10.	Ubicación geográfica, área de estudio	46
Figura 11.	Ubicación de los 13 puntos de muestreo	48
Figura 12.	Fragmentos del gen de la β-giardina	52
Figura 13.	Parásitos encontrados por tipo de hortaliza	59
Figura 14.	Detección general molecular de *Toxoplasma gondii, Blastocystis* spp*, Giardia duodenalis y Cryptosporidium* spp	61
Figura 15.	Visualización del producto de PCR para detección general de *Toxoplasma gondii*	61
Figura 16.	Visualización del producto de PCR para detección general de *Blastocystis*	62
Figura 17.	Producto de la segunda ronda de PCR para detección general de *Giardia duodenalis*	62
Figura 18.	Representación gráfica de los valores obtenidos para la diversidad genética de *Blastocystis* spp	63
Figura 19.	Productos de PCR específicos para subtipos de *Blastocystis* spp	64
Figura 20.	Electroforesis de los productos de digestión del fragmento de 384 pb del gen β-giardina	65
Figura 21.	Representación grafica de los valores obtenidos de poliparasitismo en 6 muestras de hortalizas con coinfección	65

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Clasificación taxonómica de *Giardia duodenalis*	23
Tabla 2.	Los 7 genotipos de *Giardia duodenalis*	27
Tabla 3.	Clasificación taxonómica de *Blastocystis* spp	31
Tabla 4.	Taxonomía de *Toxoplasma gondii*	38
Tabla 5.	Taxonomía de *Cryptosporidium* spp	44
Tabla 6.	Puntos de muestreo de material vegetal	47
Tabla 7.	Primers para detección de *Giardia duodenalis*	51
Tabla 8.	Mezcla de reacción para PCR de *Giardia duodenalis*	51
Tabla 9.	Perfil térmico para PCR de *Giardia duodenalis*	52
Tabla 10.	Primers para detección general de *Blastocystis* spp	53
Tabla 11.	Primers para caracterización de subtipos de *Blastocystis* spp	53
Tabla 12.	Mezcla de reacción para PCR de *Blastocystis* spp	54
Tabla 13.	Perfil térmico para PCR general y subtipos de *Blastocystis* spp	54
Tabla 14.	Primers para detección de *Toxoplasma gondii*	55
Tabla 15.	Mezcla de reacción para PCR de *Toxoplasma gondii*	56
Tabla 16.	Perfil térmico para PCR de *Toxoplasma gondii*	56
Tabla 17.	Primers para detección de *Cryptosporidium* spp	57
Tabla 18.	Mezcla de reacción para PCR de *Cryptosporidium* spp	57
Tabla 19.	Perfil térmico para PCR de *Cryptosporidium* spp	58

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo A.	Formato de recolección y control de muestras	101
Anexo B.	Consentimiento informado para toma de muestras (NAIZIR)	104
Anexo C.	Método de flotación con sulfato de zinc	105
Anexo D.	Protocolo de extracción de ácidos nucleicos (FCAI)	106
Anexo E.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%	108
Anexo F.	BLAST descriptivo de los primers usados en la detección	111

RESUMEN

Los parásitos intestinales constituyen un problema de salud pública a nivel mundial; su potencial para la producción de diversas formas infecciosas y la adaptación al medio ambiente, determinan su capacidad de sobrevivir en microclimas húmedos durante periodos prolongados, representando así una amenaza persistente para la salud, contaminando el agua, el suelo y los alimentos. El aumento de la demanda de recursos hídricos y alimenticios, incrementa la probabilidad de encontrar productos contaminados; igualmente, el consumo de verduras crudas, con poca cocción y sin lavados adecuados con el fin de retener el sabor natural, propiedades y nutrientes, se han convertido en prácticas que contribuyen a la infección oral por parásitos intestinales. Se han reportado numerosos brotes de parasitosis transmitidas por el agua y los alimentos, sin embargo, se deben realizar nuevos trabajos centrados en identificar la dinámica, persistencia y frecuencia de contaminación del agua, frutas y verduras en diferentes regiones geográficas.

El presente trabajo se enfocó en la detección molecular de cuatro parásitos principales y actualmente, de los más comunes a nivel mundial, encontrando unas prevalencias del 8% para *Giardia duodenalis* genotipo AII*,* 22% para *Toxoplasma gondii,* 19% distribuidos en tres subtipos (ST1, ST2, ST3) para *Blastocystis* spp. *y* 0% para *Cryptosporidium* spp. en un total de 100 muestras de alimentos entre fresas, zanahoria, lechuga (variedad lisa y crespa), apio, cilantro y cebolla larga comercializadas en Ibagué; estandarizando un método de concentración de quistes a partir de material vegetal y aportando nueva información sobre la contaminación parasitaria en alimentos.

Palabras clave: *Blastocystis spp, Cryptosporidium spp*, frutas*, Giardia duodenalis*, hortalizas, parásitos intestinales*, Toxoplasma gondii.*

ABSTRACT

Intestinal parasites have been documented as a public health problem worldwide; its potential for the production of a large number of infectious forms and adaptation to the environment, determine its ability to survive in humid microclimates for prolonged periods, representing a persistent threat to health, contaminating water, soil and food. The increase in the demand for water and food resources increases the probability of finding products contaminated with parasites; Likewise, the consumption of raw vegetables, with little cooking and without adequate washes in order to retain the natural flavor, properties and nutrients, have become practices that contribute to oral infection by intestinal parasites. Numerous outbreaks of parasitic diseases transmitted by water and food have been reported, however, new work should be carried out focused on identifying the dynamics, persistence and frequency of contamination of water, fruits and vegetables in different geographical regions.

The present work focused on the molecular detection of four parasites protagonists and currently of the most common worldwide, finding prevalence's of (8% belonging to genotype AII) for *Giardia duodenalis*, (22%) in *Toxoplasma gondii*, (19% distributed in three subtypes (ST1, ST2, ST3)) for *Blastocystis* spp and (0%) for *Cryptosporidium* spp, in a total of 100 samples between strawberries, carrots, lettuce (smooth variety and crisp), celery, coriander and long onion marketed in Ibague; standardizing a method of concentration of cysts from plant material and providing new information on parasitic contamination in food.

Keywords: Intestinal parasites, vegetables, fruits, *Giardia duodenalis, Toxoplasma gondii, Blastocystis spp* and *Cryptosporidium spp.*

INTRODUCCIÓN

La literatura internacional, muestra un aumento progresivo de los parásitos intestinales como un problema de salud pública a nivel mundial; presentes en reservorios de origen humano o animal y encontrándose en variedad de regiones tropicales y templadas. Los parásitos son causantes de varias enfermedades, desde incómodas hasta debilitantes y mortales; debido a sus múltiples ciclos de vida y tamaños, resisten infectivamente por largos períodos en el medio ambiente.

En frutas y vegetales de consumo fresco, se ha reportado la presencia de estos parásitos aún en países desarrollados, una tendencia que se mantiene debido a la contaminación, las falencias en seguridad alimentaria, el deficiente tratamiento de aguas residuales y el crecimiento de la población; el cual, es paralelo a la cantidad de residuos domésticos y eliminación de excretas que contaminan las quebradas, ríos y lagunas.

La variabilidad de los agentes patógenos, el porcentaje de contaminación en los vegetales y la diversidad de regiones afectadas, indican que se trata de un problema con amplia distribución geográfica y afecta tanto a las zonas rurales como las metropolitanas, poniendo en riesgo todos los días la salud de cientos de personas (Tórtora, 2003). A pesar de ser un factor de riesgo, no hay un enfoque legislativo en cuanto a la contaminación parasitaria en verduras, frutas y otros vegetales para el consumo humano, lo cual puede reflejar un descuido en la cadena de producción, en consecuencia, la distribución de alimentos previamente contaminados por la falta de normas de salud sobre el tipo de fertilizantes, el riego, la manipulación y el transporte (Falavigna et al., 2005).

Al menos 20 especies de parásitos pueden contaminar los vegetales, entre las cuales se destacan: *Giardia* spp, *Cryptosporidium* spp, *Entamoeba* spp, *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii*, *Blastocystis* spp, *Balantidium coli*, *Ascaris* spp, *Toxocara* spp, *Hymenolepis* spp, *Taenia* spp, oxiuros, uncinarias y tricocéfalos. Por estas razones, los

investigadores han dedicado esfuerzos en el estudio tanto de la biología, como en herramientas que mejoren el diagnóstico, la comprensión de las infecciones, dinámicas de transmisión y tratamiento de dichos parásitos en los eslabones de sus cadenas epidemiológicas.

La humanidad se encuentra actualmente enfrentada a seis desafíos globales: 1) Los efectos del cambio climático, 2) la preservación de los recursos hídricos, 3) la seguridad alimentaria, 4) el surgimiento de nuevas enfermedades infecciosas, 5) la pérdida de biodiversidad y 6) la sustitución de los combustibles fósiles por nuevas fuentes de energía (The Royal Society, 2011); teniendo en cuenta estos desafíos, en diversos países, las investigaciones demuestran que la calidad del agua para consumo humano y animal está disminuyendo por efectos de contaminación con sustancias tóxicas, insecticidas, metales pesados, microorganismos y parásitos causantes de enfermedad en humanos y animales domésticos. Estas aguas, en muchos casos sin tratamiento, son utilizadas para el riego de extensos cultivos de frutas y hortalizas entre las cuales se destacan: espinacas, cilantro, lechugas, zanahorias, pepinos, rábanos, tomates, perejil, moras, puerro, cebolla larga, berro, albahaca, hojas de mostaza, brotes de frijol mongo, repollo, pimiento verde, yerba buena, col blanca, col roja, mejorana, coliflor, fresas, eneldo y apio (Dixon, 2016).

El consumo de hortalizas y vegetales aumenta, por ser estos la mayor fuente de vitaminas A, B, C y K, fibra y de minerales como calcio, magnesio, potasio, hierro y beta-caroteno, así mismo, están presentes compuestos fitoquímicos con función antioxidante y antiinflamatoria que reducen las enfermedades cardiovasculares y poseen efectos antitumorales, (Slavin & Lloyd, 2012; Poiroux et al., 2010). Al ser consumidos crudos, estos vegetales pueden estar contaminados con quistes y huevos de parásitos, algunos de ellos potencialmente patógenos, lo que constituye un riesgo para la salud humana, generando brotes de la Enfermedad diarreica aguda (EDA).

Comprender la complejidad del problema de la contaminación microbiana de los vegetales y tener conciencia de su importancia es el primer paso para lograr una alta

calidad en los productos hortícolas. Aún con los avances tecnológicos, no es posible eliminar el riesgo en forma total, por lo que es necesario establecer medidas para reducirlo. Es preferible, más efectivo y económico, prevenir la contaminación microbiana en las frutas y hortalizas que eliminarla una vez que tiene lugar (Matthews, 2008; CAC, 2003; FAO, 2006).

Durante los últimos 15 años se han desarrollado métodos moleculares para la detección y caracterización de los parásitos basados en la amplificación de regiones de ADN como la subunidad 16S rDNA, 18S rDNA, ITS-1, ITS-2, B1, Beta-Giardina, Triosafosfato isomerasa, Glutamato deshidrogenasa, CP8, entre otros. Este sería uno de los primeros trabajos en Colombia y el primero en el departamento del Tolima sobre detección molecular y caracterización directa de parásitos en frutas y hortalizas de consumo fresco, para desarrollar a mediano plazo métodos de control de calidad en estos alimentos de consumo interno o de exportación.

El presente trabajo se enfocó en la búsqueda de cuatro parásitos principales, de los más comunes actualmente a nivel mundial: *Giardia duodenalis, Toxoplasma gondii, Blastocystis spp y Cryptosporidium spp* en un total de 100 muestras de fresas, zanahoria, lechuga (variedad lisa y crespa), apio, cilantro y cebolla larga comercializadas en Ibagué, estandarizando un método para concentración de quistes en hortalizas y realizando la caracterización molecular a cada muestra positiva.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Giardia duodenalis, Blastocystis* spp*, Toxoplasma gondii y Cryptosporidium* spp en hortalizas comercializadas en el casco urbano de la ciudad de Ibagué.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.2.1. Estandarizar una metodología para la concentración y obtención de quistes de parásitos viables a partir de material vegetal.

1.2.2. Detectar a través de métodos moleculares los parásitos *Giardia duodenalis*, *Toxoplasma gondii, Blastocystis* spp. y *Cryptosporidium* spp. en 100 muestras de hortalizas seleccionadas en diferentes puntos de la ciudad.

1.2.3. Identificar los genotipos de *Giardia duodenalis* y subtipos de *Blastocystis spp*, presentes en las muestras positivas de fresas, zanahorias, lechugas (variedad crespa y lisa), apio, cilantro, y cebolla larga previamente procesadas.

2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

2.1. PARÁSITOS EN FRUTAS Y HORTALIZAS

2.1.1. Generalidades. Los parásitos intestinales tienen una distribución geográfica mundial principalmente en la región tropical y subtropical. Ocupan un papel relevante en la salud pública por los elevados índices de prevalencia y las implicaciones clínicas y sociales que conllevan (Rea 2004). Entre las vías de infección para el ser humano, una de las principales es la oral. Se considera que el agua y los alimentos contaminados sirven de vehículo a las fases exógenas de los parásitos, como los huevos, las larvas de los helmintos y los quistes de los protozoos (Quevedo, 1980; OMS, 1986). Entre esos transmisores pasivos figuran las verduras que se consumen crudas. La importancia de este eslabón en la cadena de transmisión epidemiológica es aún desconocida en varias regiones. Adicionalmente, la facilidad de la contaminación, la falta de saneamiento y las políticas estructurales de vigilancia de las enfermedades parasitarias contribuyen a esta situación.

La infección alimentaria por protozoos y helmintos transmitidos por la ingestión de vegetales que se comen crudos, es uno de los factores que conducen a la propagación de estas enfermedades. Este aumento se debe a varios factores, entre ellos la expansión del comercio internacional de productos, los cambios en los hábitos alimenticios, el consumo fuera del hogar de comidas rápidas y preparadas con anterioridad y el crecimiento desordenado de la población en centros urbanos, donde no siempre hay disponibilidad de agua potable, mal tratamiento de aguas residuales y desechos sólidos como consecuencia del crecimiento poblacional acelerado (Capuano, 2002; Käferstein, 1999; Falavigna et al., 2005).

Varios estudios indican la importancia de la contaminación por parásitos en los vegetales, debido a que el consumo de frutas y hortalizas frescas es parte importante de una dieta saludable, desde el punto de vista microbiológico son alimentos comparativamente de menor riesgo que las carnes y los productos lácteos. Sin embargo, al ser consumidos sin

ningún tipo de cocción, son potencialmente peligrosos en caso de que exista contaminación (Silva, 2005; FAO, 2003; Matthews, 2008).

El agua contaminada por materia fecal de origen humano, a menudo es utilizada para el riego de jardines y la contaminación de los alimentos por manipuladores infectados también puede ser una de las causas de contaminación de vegetales (Faria, 1987; Silva, 2005). En los últimos años se ha detectado un mayor número de enfermedades transmitidas por frutas y hortalizas contaminadas, la información disponible muestra que es un problema que crece en importancia. Los riesgos biológicos asociados a los productos hortícolas están relacionados con las malas prácticas de producción, como el empleo de agua de riego contaminada, el uso de desechos biológicos sólidos como fertilizante sin tratamiento o con tratamiento inapropiado, la presencia de animales en las áreas de cultivo, la proximidad a zonas de acumulación de aguas albañales o sólidos orgánicos, una inadecuada higiene de las instalaciones, entre otros (Hernández, 2010; Struelens et al., 2011; Salomón, 2008).

Diversos estudios describen contaminación con parásitos y comensales en una variedad de hortalizas que se consumen crudas. Entre los principales contaminantes se encuentran: *Entamoeba histolytica / Entamoeba dispar, Blastocystis hominis, Giardia lamblia, Cryptosporidium* spp*., Endolimax nana, Entamoeba coli, Hymenolepis nana, Fasciola hepatica, Strongyloides stercoralis, anquilostomideos, Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura, Enterobius vermicularis, Toxocara canis, Taenia* spp*, Trichostrongylus* spp*., Toxoplasma gondii,* ácaros, insectos, larvas de nematodos y protozoarios de vida libre (Castro et al., 1995; Coaguila, 1993; Coelho, 2001; Daryani, 2008; Erdogrul, 2005; Guimaraes, 2003; Mesquita, 1999; Oliveira et al., 1992a,b; Soares, 2006; Takayanagui, 2001, 2006;).

2.1.2. Prevalencia de parasitosis intestinales

2.1.2.1. A nivel mundial: La Organización Mundial de la Salud – OMS estimó que en el año 2001 había 3500 millones de personas infectadas por parásitos y de ellos

aproximadamente 450 millones padecían enfermedad parasitaria y de ésta la mayor proporción correspondía a la población infantil (Espinosa et al., 2011). Así mismo la OMS reporta que aproximadamente 1500 millones de personas, casi el 24% de la población mundial, está infectada por geohelmintos y la OPS estima que la prevalencia de geohelmintiasis en los países de América Latina y el Caribe es mayor del 20% de la población y esta proporción puede llegar hasta 90% en las zonas con más bajos recursos (RMETD, 2011; OMS, 2015). Se ha estimado que el 10% de la población mundial alberga el 70% de la infección por geohelmintos, de tal manera que muchos hospederos humanos tienen pocos parásitos y unos pocos hospederos muchos parásitos (RMETD, 2011).

Las principales fuentes de infección para contraer parásitos intestinales son los alimentos, vegetales, tierra y manos o uñas sucias, carencia de condiciones de saneamiento básicas y malos hábitos de higiene personal (Tan, 2008). De igual manera, la presencia, persistencia y diseminación de los parásitos intestinales también se relacionan en forma directa con factores ambientales, socioeconómicos y culturales predisponentes (Stensvold, 2013). Por ejemplo, la ascaridiasis es considerada un indicador biológico del estado de salud y desarrollo global de una región (Agudelo et al., 2008; Stensvold, 2006; Mandell, 2009; Kobayashi, 2006).

2.1.2.2. En Colombia: La primera encuesta nacional que mostró la prevalencia de parásitos intestinales fue realizada entre los años 1965 y 1966, en esta, se encontró que el 88% de la población colombiana estaba parasitada y de esta cifra el 80% correspondían a parásitos patógenos. Posteriormente, se realizó el Estudio Nacional de Salud que comprendió el período entre mayo de 1977 y noviembre de 1980, donde la prevalencia global encontrada fue del 81,8% y de ellos un 63,6% correspondían a parásitos patógenos (Corredor, 2000). Desde entonces, se han realizado diferentes estudios de forma aislada con población general, población indígena y/o niños en los cuales se ha buscado establecer frecuencias de parasitismo a escala local.

En población general, evaluando muestras de materia fecal procesadas por coprológico directo y coprológico por concentración con la técnica de Ritchie modificado, un estudio publicado en el 2013 en Medellín-Antioquia con 309 personas reveló que 230 (74,4%) estaban parasitadas y de ellas el 30,7% eran debidas a infecciones por patógenos intestinales (Cardona, 3013); otro estudio utilizando las mismas técnicas de diagnóstico en el corregimiento de Loma Arena-Bolívar en 2004 con 382 voluntarios encontró que el 92% (352 personas) presentaba algún parásito intestinal patógeno (Agudelo et al., 2008); y finalmente un estudio realizado entre 1996 y 1998 sólo empleando la técnica de concentración de Ritchie en el municipio Arboleda-Nariño reportó 145 (67.7%) casos positivos de parasitismo intestinal (Sanzón, 1999).

En niños y adolescentes, se han realizado diferentes estudios en Colombia, analizando muestras de materia fecal por coprológico directo y coprológico por concentración con la técnica de Ritchie. Para el departamento de Antioquia entre los años 1996 y 1998, Arboleda y colaboradores, determinaron la frecuencia de parásitos intestinales en 420 niños escolarizados del municipio de Apartadó entre los 2 y 10 años de edad encontrando que el 80% (336) de los infantes evaluados tenían algún parásito intestinal y de estos el 93,5% eran patógenos (Arboleda et al., 2004). Luego en Medellín se realizaron dos estudios: el primero en 1999 con 960 niños entre 6 y 18 años, donde se reportaron frecuencias del 50,7% para alguna parasitosis intestinal, y de ellas 28,8% para potenciales patógenos (Agudelo et al., 1999), y el segundo en el año 2007 con 58 niños entre 4 y 15 años, con frecuencias del 91,3% para alguna parasitosis intestinal y de éstos 88,9% con algún patógeno.

En Colombia se han realizado otros estudios de parasitismo intestinal, dentro de los cuales se destacan el estudio sobre deficiencias nutricionales y prevalencia de poliparasitismo en la población infantil (Castro, 1998) y un estudio de prevalencia de geohelmintos en el municipio de La Virgen, Cundinamarca (Fernández et al., 2007). La historia natural de las parasitosis ha evolucionado de forma paralela a la de sus huéspedes, debido a que las modificaciones y cambios realizados en el hombre y su entorno modifican la prevalencia de ellas en una población; se ha determinado que estas

infecciones se asocian a factores como pobreza, inadecuada sanidad ambiental y precarios e improvisados servicios de salud (W.H.O, 2006). Es por ello que estos parásitos intestinales son considerados el principal problema de salud pública para algunos países en vía de desarrollo (Mandell, 2009; Sturrock et al., 2009).

Figura 1. Prevalencia de protozoos patógenos intestinales. Encuesta Nacional de Parasitismo Intestinal en Población Escolar, Colombia 2012 – 2014.

Variables	Estimadores	Nacional	PROVINCIAS BIOGEOGRÁFICAS							
			I. Territorios Insulares Oceánicos del Caribe	III. Cinturón Árido Pericaribeño	IV. Sierra Nevada de Santa Marta	V. Chocó - Magdalena	VI. La Orinoquia	VII. La Guayana	VIII. La Amazonia	IX. Norandina
Entamoeba histolytica/ dispar	*Prevalencia*	**17**	5,9	32,4	**48,0**	21,5	13,2	14,5	12,5	11,8
	I.C	12,9 – 22	2,7 - 12,5	26 - 39,6	44,7 - 51,3	14,2 - 31,3	8,4 - 20,1	13,6 - 15,4	11,5 - 13,7	8 - 17,1
	Error	2,2	2,3	3,4	1,6	4,3	2,9	0,4	0,5	2,3
Giardia lamblia	*Prevalencia*	**15,4**	7,8	24	20,5	17	15,9	19	**37,3**	11,2
	I.C	11,8 – 20	2,3 - 7,8	3,4 - 24	1,6 - 20,5	4,3 - 17	2,9 - 15,9	0,4 - 19	0,5 - 37,3	2,3 - 11,2
	Error	2	3,4	1,9	2,2	3,2	2,8	0,5	0,6	2,6
Cryptosporidium spp	*Prevalencia*	**0,5**	3,9	0,6	0	0,5	0	0	0	0,7
	I.C	0,3 – 1	0,9 - 15,1	0,2 - 2,3	0 - 0	0,1 - 1,7	0 - 0,3	0 - 0	0 – 0	0,4 - 1,3
	Error	0,2	2,8	0,4	0	0,3	0	0	0	0,2
Blastocystis spp Más de 5 por campo	*Prevalencia*	**5,6**	2	16,7	17,9	5,1	1,7	1,9	0,6	5,1
	I.C	4,2 - 7,5	0,5 - 7,8	13,9 - 19,9	15,8 - 20,2	3,3 - 7,8	0,5 - 5	1,6 - 2,1	0,4 – 1	3 - 8,4
	Error	0,8	1,4	1,5	1,1	1,1	0,9	0,1	0,1	1,3
Blastocystis spp Menos de 5 por campo	*Prevalencia*	**52,1**	3,9	40,7	40,8	52,1	49	48,7	40,1	**55,2**
	I.C	49,2 - 54,9	0,9 - 15,1	37,1 - 44,4	38,4 - 43,2	45,1 - 59	38,8 - 59,3	47,4 - 50	34,9 - 45,4	52 - 58,3
	Error	1,4	2,8	1,8	1,2	3,5	5,2	0,6	2,6	1,6

I.C. Intervalo de Confianza

Fuente: Valderrama (2013)

2.2. *GIARDIA DUODENALIS*

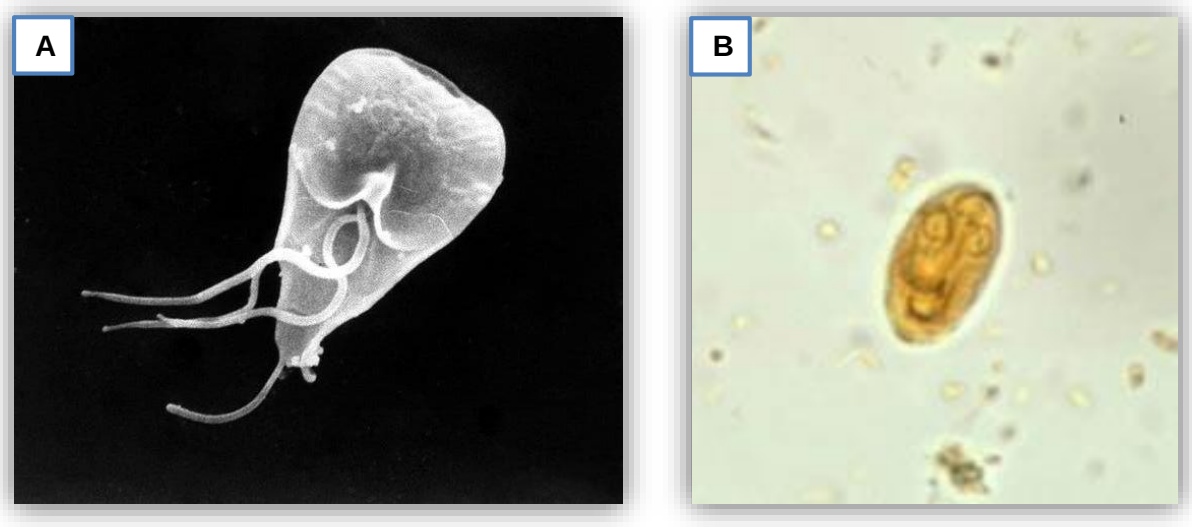
Llamado *Giardia duodenalis, Giardia intestinalis* o *Lamblia intestinalis.* Es un protozoo flagelado, perteneciente al filo Metamonada. Descubierta en 1681 por Antonie van Leeuwenhoek en sus propias heces; es uno de los enteroparásitos encontrados con más frecuencia en el mundo occidental. Es parásito de varios mamíferos, incluyendo el ser humano. Vive en el intestino delgado y provoca una patología denominada giardiosis, giardiasis o lambliasis, cuando son ingeridos con el agua o los alimentos contaminados, o por las manos sucias (Korman & Deckelbaum, 1993).

2.2.1. Morfología: *Giardia duodenalis* presenta dos formas morfológicas: el trofozoíto o forma móvil y el quiste, una forma más pequeña que resiste las condiciones medioambientales adversas (Figura 2). La forma móvil se encuentra como parásito en el tubo digestivo del hombre y la forma de resistencia (quiste) es expulsada en la materia fecal y se encuentra en el medio ambiente (Gassman & Schwartzbrod, 1991). El trofozoíto tiene una forma muy característica, tiene simetría bilateral, es periforme, con un extremo anterior ancho y un extremo posterior sumamente delgado (Romero, 1993). En la parte anterior o más alta tiene una estructura llamada disco suctor, que le permite adherirse al epitelio intestinal, con una parte central rígida llamada axolema o axostilo, que tiene como función servir de esqueleto (Tay, 1993). Es anaerobio aerotolerante, heterótrofo y se multiplica por fisión binaria longitudinal cada 9 a 12 horas (Piekarsky, 1989). Tiene forma de pera, mide de 9 a 21 micras (µm) de largo y de 5 a 15 µm de ancho y su espesor es de 2 a 4 µm; presenta dos núcleos colocados en la parte anterior, un disco ventral convexo en la mitad anterior, con el que se adhiere a la mucosa intestinal, y cuatro pares de flagelos que participan en la locomoción (INST, 2015).

Los quistes presentan una estructura ovalada, con paredes finas y un tamaño de 11-14 µm de longitud, de 7-10 µm de ancho y de 0,3-0,5 µm de espesor (INST, 2015). Tiene como carácter fundamental ser la fase de resistencia que le permite vivir en el medio ambiente, esta característica es gracias a la pared gruesa llamada pared quística. En el interior de su citoplasma contiene núcleos, los quistes maduros tienen cuatro y los

inmaduros dos, tiene restos de flagelos y a veces de cuerpos parabasales (Romero, 1993).

Figura 2. Estados morfológicos de *Giardia duodenalis:* A) Forma vegetativa móvil, parasita el intestino delgado (Trofozoíto). B) forma de vida libre e infectante (Quiste).



Fuente: phil.cdc.gov

2.2.2. Taxonomía

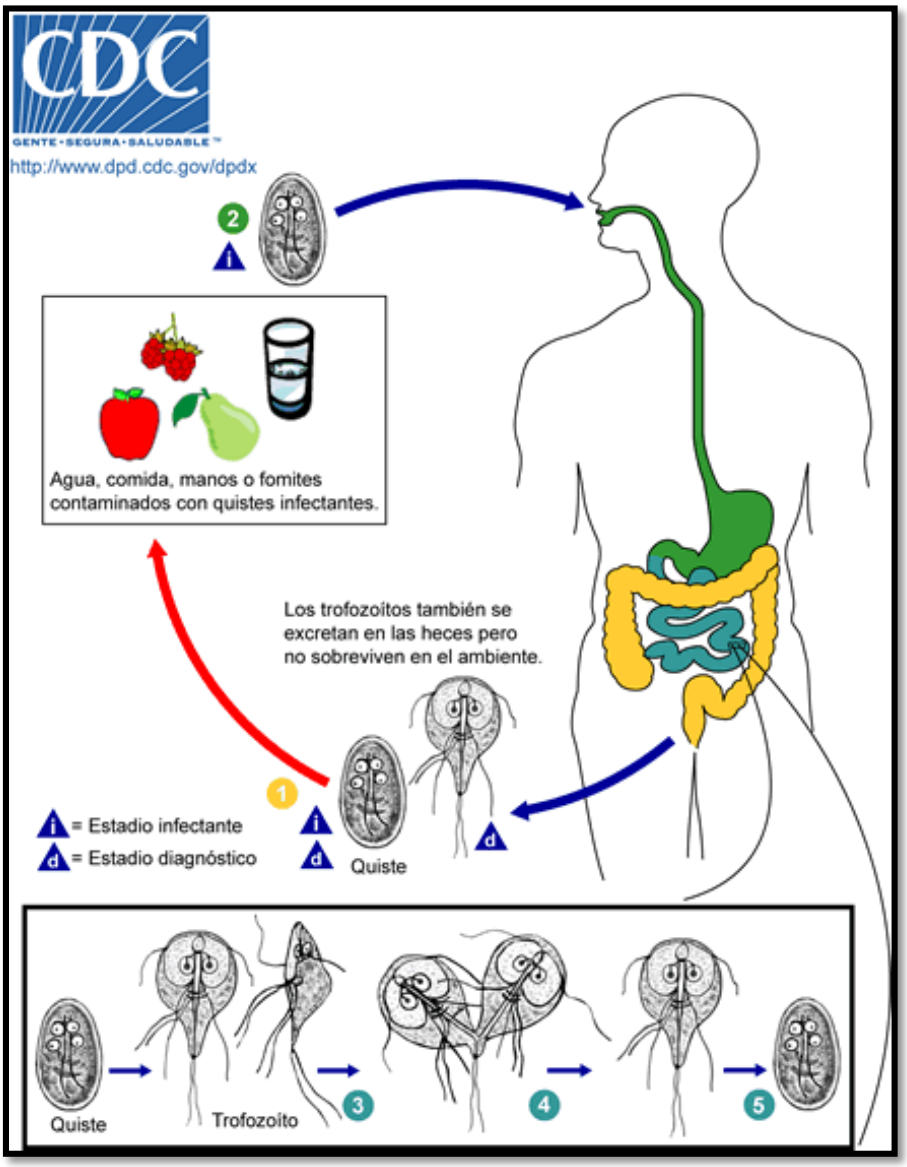
Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Giardia duodenalis*

Reino	Protista
Subreino	Excavata
Filo	Metamonada
Clase	Fornicata
Orden	Diplomonadida
Suborden	Giardiina
Género	*Giardia*
Especie	*G. duodenalis (*Sin*. G. intestinalis, G. lamblia)* Kunstler, 1882

Fuente: Alcaraz (2001)

2.2.3. Ciclo biológico

Figura 3. Ciclo de vida de *Giardia duodenalis***.**



Fuente: www.cdc.gov

1). Los quistes son formas resistentes responsables de la transmisión de la giardiasis. Los quistes y trofozoítos se encuentran en las heces (estadio diagnóstico). 2) Los quistes son muy resistentes y sobreviven por varios meses en agua fría. La infección ocurre por la ingestión de quistes en agua y alimentos contaminados, o por la ruta fecal-oral en las manos o fomites). 3) En el intestino delgado, la eclosión libera a los trofozoítos

(cada quiste produce dos trofozoítos). 4) Los trofozoítos se multiplican longitudinalmente por fisión binaria, permaneciendo en el lumen del intestino delgado proximal donde pueden estar libres o adheridos a la mucosa por el disco de succión ventral. 5) El enquistamiento ocurre cuando el parásito transita hacia el colon. El estadio de quiste se encuentra más comúnmente en las heces no diarreicas y/o con moco (CDC, 2019).

2.2.4. Epidemiología: Esta parasitosis es de distribución cosmopolita. Su frecuencia varía de acuerdo al nivel educativo de la gente y de las condiciones sanitarias y climatológicas de cada región. De este modo se presenta más en niños que en adultos, y en regiones tropicales que en zonas frías. La infección se adquiere por vía oral mediante la ingesta de alimentos y bebidas contaminadas con quistes de *G. lamblia.* La prevalencia de la giardiasis varía entre el 1% y el 60% según la región. Se estima que unos 200 millones de seres humanos son infectados anualmente por este parásito (Tay, 1993). La giardiasis es considerada la infección por parásitos más común que afecta a los humanos en el mundo (Kucik, 2004).

2.2.4.1. Manifestaciones clínicas: La mayor parte de las veces, la infección por *G. duodenalis* permanece asintomática, situación más común en adultos que en niños (Romero, 1993). La forma sintomática se puede presentar con duodenitis, caracterizada por dolor abdominal tipo cólico y diarrea. Las heces fecales son muy olorosas ya que cuando hay un problema de defecto de absorción, el trabajo de desintegración bacteriano hace que se torne este olor. También puede originar nausea y acompañarse de anorexia, palidez y pérdida de peso (Biagi, 1988).

2.2.4.2. Diagnóstico: Se realiza al observar los parásitos al microscopio, mediante estudios coproparasitoscópicos. No existen métodos serológicos ni de cultivo útiles en la práctica. La excreción de quistes no es permanente ni constante, eso quiere decir que dos o tres exámenes negativos no descartan que el individuo tenga giardiasis, por lo que se recomienda se estudien tres muestras o más. Los trofozoítos los podemos buscar en un individuo que tenga diarrea, en un examen en fresco. Los quistes pueden ser concentrados mediante procesos de flotación o sedimentación (Marquardt, 1985). La otra

posibilidad es hacer un estudio de contenido duodenal para llegar hasta el habitat del parasito, sacar un poco de material que ahí se encuentre y verlo al microscopio. Para esto, se utiliza una capsula de Beal, que es una cápsula de gelatina con un hilo de nylon y de algodón en su interior (Romero, 1993). El hilo se traga en ayunas, se le deja todo el día y se le pide al paciente que camine y que se acueste un rato del lado derecho para ayudar así a que llegue al duodeno. 4 o 5 horas después se extrae el hilo que se ha pegado a la mejilla del paciente, si el líquido es amarillo verdoso es que llegó al duodeno. Se exprime y el material se lleva al microscopio. En un examen directo en fresco se ve la presencia de trofozoítos. La otra posibilidad es el sondeo duodenal, donde se introduce una sonda para sacar contenido duodenal y observarlo ante el microscopio buscando la presencia de trofozoítos (Biagi, 1988).

2.2.4.3. Tratamiento: las posibilidades de tratamiento son furazolidona, tinidazol, metronidazol y secnidazol. La profilaxis se encamina hacia el manejo adecuado de las excretas, con el fin de no ingerir materia fecal con quistes de *G. duodenalis* evitando así esta parasitosis (Romero, 1993).

2.2.5. Genotipos de *Giardia duodenalis*: *Giardia* es considerada como un complejo de especies, cuyos miembros muestran variaciones muy ligeras en su morfología, y se pueden agrupar en siete grupos genéticos diferentes asignados con las letras A a la G basados en polimorfismos en sus proteínas y ADN. Entre los siete genotipos, solo el A y el B han sido encontrados en humanos y en otros hospederos mamíferos, mientras que los genotipos C al G parecen ser específicos de hospederos (Tabla 2). La carencia de características morfológicas para discriminar las variantes dentro de *Giardia spp.* ha limitado el entendimiento de la taxonomía, epidemiología e impacto en la salud pública de este género de importancia clínica. Las herramientas moleculares han causado un enorme impacto en el conocimiento de la naturaleza de la variación de este parásito (Savioli, 2006).

Tabla 2. Los 7 genotipos de *Giardia duodenalis* y su distribución en hospederos mamíferos.

Genotipo	Hospedero
A	Humanos, primates no humanos, ganado bovino, equinos, caninos, felinos, conejillo de indias, ciervos de cola blanca, venados, alces, hurones
B	Humanos, primates no humanos, ganado bovino, equinos, caninos, coyotes, ratas almizcleras, castores
C, D	Perros, gatos, coyotes, lobos
E	Bovinos, ovinos, caprinos, búfalos de agua, muflón
F	Gatos
G	Ratas

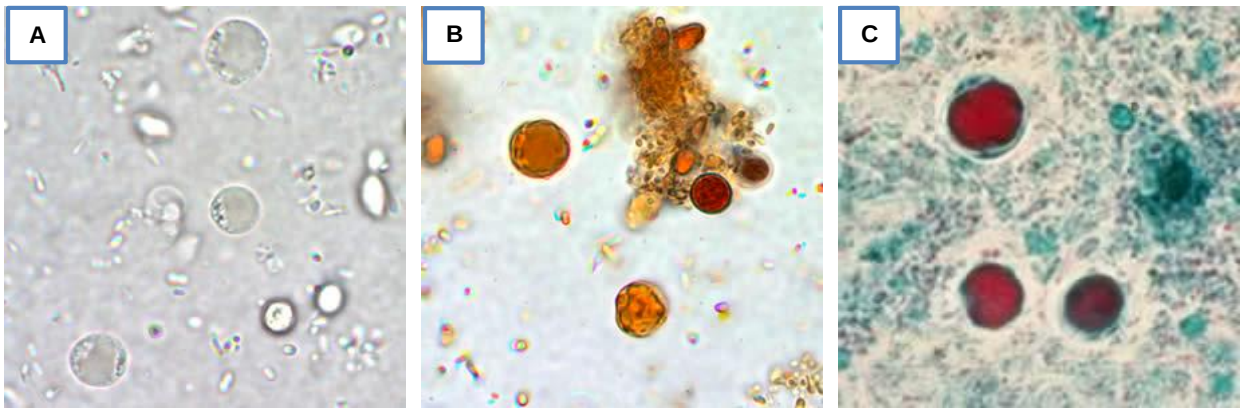
Fuente: Caccio & Sprong, 2010

Giardia duodenalis no es una especie uniforme, es considerada como un complejo de especies genéticamente divergentes entre ellas; estas agrupaciones genéticas están distribuidas a través de una amplia geografía y son genéticamente conservadas. Los aislados de *Giardia duodenalis* a partir de heces humanas pertenecen principalmente a dos genotipos conocidos como A y B los cuales están ampliamente distribuidos geográficamente. El genotipo A posee dos subgrupos principales: AI se ha encontrado principalmente en aislados de animales y humanos cercanamente relacionados, este subgrupo está generalizado a través de la geografía y su presencia demuestra el potencial zoonótico de *G. duodenalis*, el segundo subgrupo AII, ha sido aislado principalmente de humanos. El genotipo B, con los dos subgrupos III y IV se presenta de igual manera en el hombre (Thompson, 2004).

2.3. *BLASTOCYSTIS* SPP

Blastocystis spp es un microorganismo cuya clasificación es discutida; habitualmente se conoce como perteneciente al Phylum protozoa, pero algunas características moleculares sugieren su ubicación en el phylum heterokontophyta, del reino chromista (Ho et al., 2000; Cavalier, 1998). Se ha descrito como responsable de una enfermedad llamada blastocistosis, la cual es considerada una zoonosis con reportes de casos en ratas, aves, cerdos y vacunos. Se encuentra ampliamente distribuido y es uno de los parásitos intestinales más frecuentes en humanos (Cavalier, 1998; Tan, 2008), actualmente es considerado un parásito emergente oportunista de importancia en la salud pública internacional (Stensvold, 2013; Wawrzyniak et al., 2013).

Figura 4. *Blastocystis* spp forma vacuolar: A). Observación en fresco. B). Tinción de yodo. C). Tinción Ziehl-Neelsen.

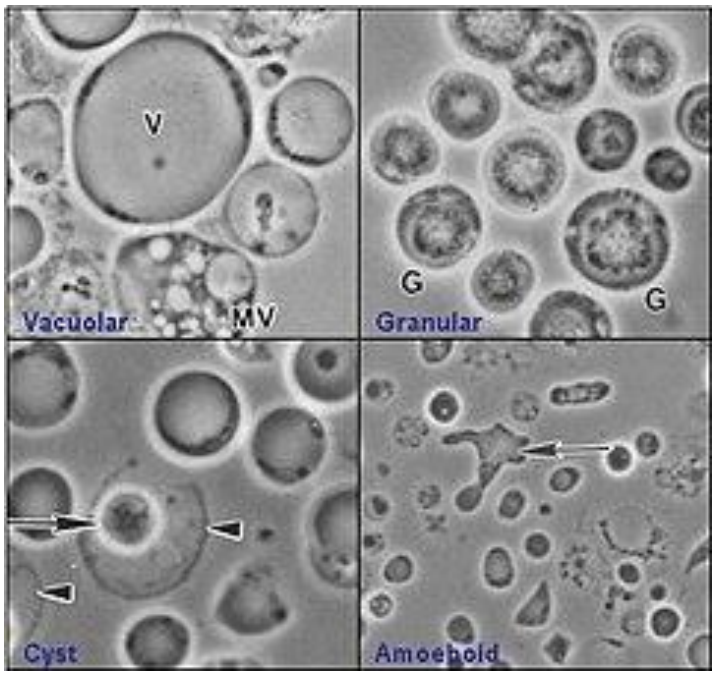


Fuente: www.mcdinternational.org

2.3.1. Morfología: El organismo demuestra marcada variabilidad morfológica y mide entre 5 a 40 micrómetros (Figura 4). Carece de pared celular, pero contiene mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso. Su reproducción es usualmente por fisión binaria y crece en cultivos bajo condiciones anaeróbicas (Stenzel, 1996). Estudios ultraestructurales recientes indican que existen una serie de variantes morfológicas de *Blastocystis*, en las que al parecer la forma de presentación depende del medio ambiente (Boreham, 1993; Stenzel, 1991). Factores físicos como cambios osmóticos, la presencia de ciertas drogas, y el status metabólico pueden influenciar la morfología del organismo *in vivo* e *in vitro* (Stenzel, 1996).

- Formas multivacuolar y avacuolar: La morfología de *Blastocystis* presente en materia fecal humana fresca puede diferir significativamente de las presentes en cultivos (Zierdt, 1991; Dunn, 1989) en contraposición a la gran vacuola única presente en células de cultivo, múltiples vacuolas de diferentes tamaños son frecuentemente halladas en células de material fecal. Algunos reportes han descrito esta forma de *Blastocystis* como la presentación del organismo en el intestino del hospedero humano (Figura 5) (Zierdt, 1976; Narkewicz, 1989).
- Forma ameboide: El estadio ameboide es observado más frecuentemente en cultivos viejos o luego de la administración de antibióticos (Zierdt, 1991).
- Forma quística: La forma quística de *Blastocystis* probablemente confiera resistencia al medio externo como es el caso de varios protozoarios, aunque no ha sido confirmado experimentalmente (Stenzel, 1996).

Figura 5. Estados morfológicos de *Blastocystis* spp. V: Forma vacuolar: Una gran vacuola central con variación en su tamaño. G: Formas granulares: Con gránulos distintos que llenan el cuerpo central. A. Forma ameboide: con pseudópodos característicos y C: formas quísticas (infectantes).



Fuente: https://upload.commonsBlastocystis_hominis_Valzn.jpg

2.3.2. Taxonomía: La historia del organismo refleja la dificultad de definir su posición taxonómica. El estudio ultraestructural de Zierdt et al. (1967) confirió la primera evidencia indiscutible de que el organismo no era una levadura o un hongo, como previamente fue sugerido por Alexeieff (1911) y Brumpt (1912) ni tampoco los quistes de otro organismo como *Trichomonas* sp. como fue propuesto por Bensen (1909), Bone y Prowaseck (1908), Haughwout (1918) y James (1914). Ultraestructuralmente, la célula de *Blastocystis* presenta características similares a los organismos del reino Protista (Protozoarios): presenta uno o más núcleos, complejo de golgi y organelas mitocondria-semejantes (Boreham, 1993). Fisiológicamente, no logra crecer en medios para hongos y no son eliminados por agentes antifúngicos como anfotericina B (Dunn, 1991). *Blastocystis* es un anaerobio estricto y es sensible al oxígeno y a cambios en la tonicidad del entorno (Brumpt, 1912). Agentes antibacterianos como ampicilina, estreptomicina y gentamicina no parecen afectar adversamente el crecimiento de *Blastocystis* mientras varios antiprotozoarios parecen inhibir su crecimiento *in vitro* (Dunn, 1991; Zierdt, 1983).

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la preponderancia del análisis genético por sobre los criterios estructurales y fisiológicos en la clasificación taxonómica (Silberman, 1993). Recientes investigaciones basadas en el estudio filogenético del ARN de la subunidad pequeña ribosomal, posicionan a *Blastocystis* como el único parásito descrito en humanos perteneciente al reino Stramenopila o Chromista, el cual incluye a las algas marrones y diatomeas (Silberman, 1993) y en un consenso publicado en 2007 se uniformiza la información de los subtipos descritos previamente concluyéndose la existencia de 9 subtipos y proponiéndose la eliminación del término "*Blastocystis hominis"* dando paso a utilizarse el término *Blastocystis* sp. seguido de un subtipo del 1 al 9 en toda muestra aislada de aves y mamíferos (Stensvold, 2007). Dicho cambio en la nomenclatura obedece a la baja especificidad del germen por su hospedero lo que hace inadecuada la nomenclatura relacionada a un solo hospedero (en este caso el hombre: hominis) y en vista de la creciente evidencia a favor de la probable existencia de dos o más especies de *Blastocystis* (Stensvold, 2007; Noel et al., 2005). El término "subtipo" reemplaza a otros términos aparecidos en literatura en lengua inglesa tales como (Clado, subgrupo, clúster) (Silberman, 1993).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Blastocystis* spp.

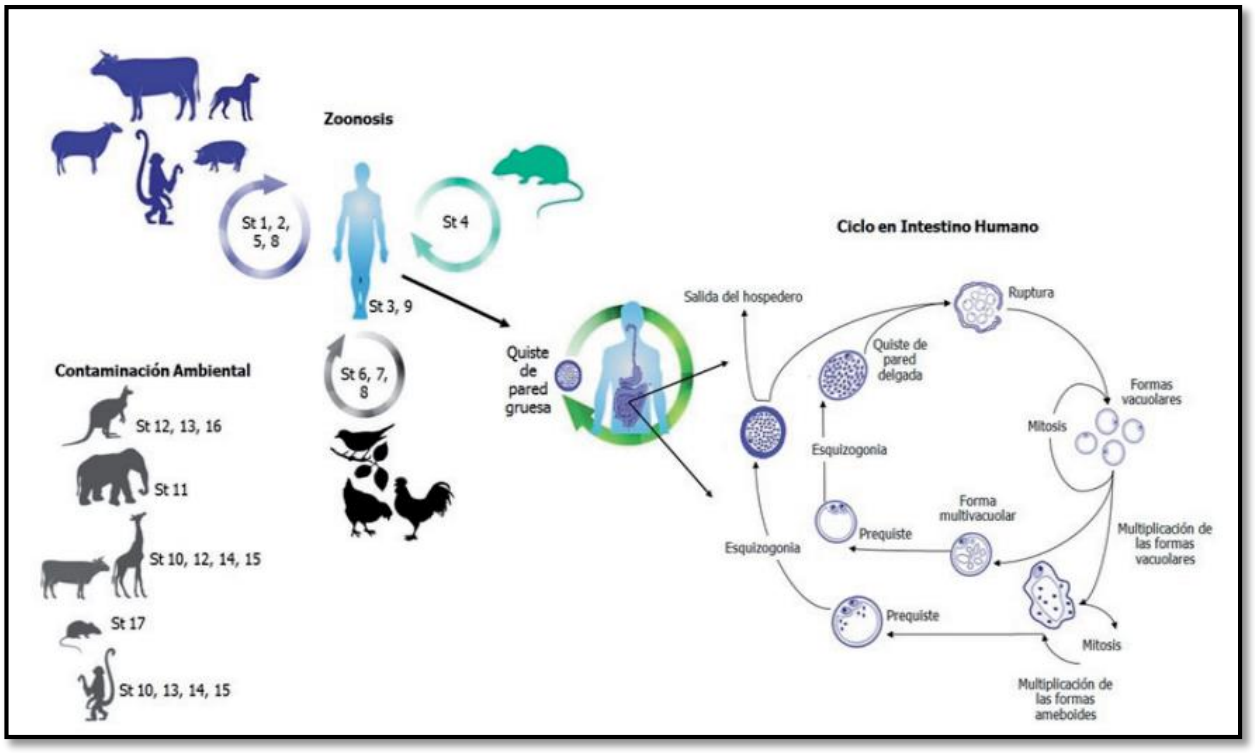
Reino	Chromista
Subreino	Harosa
Infrareino	Halvaria
Superfilo	Heterokonta o Stramenopiles
Filo	Bigyra
Subfilo	Opalozoa
Clase	Blastocystea
Orden	Blastocystida
Familia	Blastocystidae
Género	*Blastocystis* Alexieff, 1911

Fuente: Cavalier-Smith (1998)

2.3.3. Ciclo biológico. La literatura refiere las formas quísticas como mecanismo de resistencia para el protozoo *Blastocystis* spp., tanto los seres humanos como los animales son infectados por quistes fecales que al ingresar al intestino grueso cambian su forma quística a vacuolar. A su vez, han sido descritas estructuras vacuolares, ameboides y granulares como formas comunes en las preparaciones parasitológicas de rutina. Algunos investigadores consideran que uno de los principales focos infecciosos está constituido por los animales, especialmente aquellos con los que el ser humano tiene contacto frecuente. A pesar de estas evidencias, el ciclo biológico de este agente no es claro, aunque en la literatura han sido descritos los ciclos infectivo y autoinfectivo. En cualquiera de los casos (figura 6), la forma resistente (vacuolar) alcanza tránsito intestinal y allí adquiere una estructura multivacuolar que da origen al prequiste, el cual alcanza estados de maduración a través de ciclos de reproducción conocidos como esquizogonia; luego de esta división es liberado un quiste de pared delgada y frágil, de donde se origina la ruptura de la pared del quiste. La vía de transmisión de este parásito es oro-fecal. El ciclo comienza cuando el hospedero, ingiere alimentos o agua contaminada con quistes infectantes de pared gruesa de *Blastocystis* spp. Al pasar por

el tracto digestivo, se desenquistan en el estómago, gracias a la acción de las enzimas y de los ácidos gástricos. En el intestino se observa una forma avacuolar sin envoltura o cubierta celular que al pasar por el intestino y situarse en las células epiteliales se transforma en la forma multivacuolar (Parija, 2013).

Figura 6. Ciclo de vida de *Blastocystis* spp*.* (modificado). Sus Diecisiete subtipos (ST) y los respectivos hospederos intermediarios.



Fuente: Tan (2004)

2.3.4. Epidemiología: *Blastocystis* spp, es catalogado como un parásito de distribución mundial, se asocia en un 60% en zonas tropicales y subtropicales y más frecuentemente en países en vía de desarrollo, diseminándose en el consumo de alimentos y aguas contaminadas con heces, convirtiéndose en un foco de infección (Domínguez, 2003; Perales, 2010). Este parásito se encuentra en frecuencias similares en pacientes sintomáticos y asintomáticos, tiene una gran prevalencia entre los pacientes sintomáticos que están ubicados en viviendas con mal saneamiento ambiental y los rangos de

prevalencia van desde un 30-50% en países en desarrollo y 1, 5-10% en países desarrollados (Zaman, 1999).

Aunque en algunos estudios indican baja prevalencia en el Antiguo Continente, datos epidemiológicos han demostrado que esta tendencia no se mantiene en países como Indonesia (60%), Filipinas (40,7%) y Egipto (33%) (Tan, 2008). En Latinoamérica, se ha evidenciado *Blastocystis* spp. con una frecuencia de 61,6% en pacientes adultos sintomáticos, a diferencia de los asintomáticos en los que se encontró un 41,6%. En Perú un estudio en niños de 5 a 13 años demostró su presencia en un 92,3% de los participantes con sintomatología digestiva; además se ha identificado como agente causal en un 51,6% en poblaciones indígenas infantiles (Perales, 2010). Un estudio realizado en Venezuela se encontró que el 95,7% de la población está parasitada, con predominio del protozoo *Blastocystis* spp, con un porcentaje cercano al 66,7%. Lo anterior posiblemente por las condiciones socio demográficas de la población en estudio, lo que no les resta importancia a los datos, si se consideran variables sociales como desplazamiento, viajes etc., que permitirían la proliferación masiva del parásito (Alger, 1997). En Colombia la prevalencia fluctúa de 0,8% a 88,0% en diferentes poblaciones, (estudios entre 2002 a 2009 y 2010 a 2014) (Chandramathi et al., 2012).

2.3.5. Implicaciones clínicas de los subtipos de *Blastocystis* spp**.** En la figura 4 se describen los diferentes subtipos y sus hospederos intermediarios y definitivos, podemos encontrar como subtipos propios del hombre, los subtipos 3 y 9, los subtipos 1, 2, 5 y 8 se pueden observar en el hombre y mamíferos (primates, cerdos, ganado vacuno y porcino), al igual que el subtipo 4 que se encuentra en humanos y roedores y los subtipos 6, 7, 8 se encuentran en poblaciones que conviven con aves. Es propio de los marsupiales los subtipos 12,13 y 16, en elefantes el subtipo 11, en jirafas y ganado vacuno los subtipos 10, 12, 14 y 15, en roedores el subtipo 17 y en los primates no humanos los subtipos 10, 13, 14 y 15. (Wawrzyniak, 2011). La variabilidad de las cepas, y de su virulencia, puede explicar las diferencias en patogenicidad (Domínguez, 2003). Algunos autores resaltan que existen dos tamaños de forma vacuolar (dependiente del

subtipo) pequeña y grande, esta última se encuentra relacionada con la sintomatología de los pacientes (Marrugan, 1993).

Estudios realizados sobre el rol patogénico de este microorganismo clasifican a los portadores en dos grupos: sintomáticos y asintomáticos; los datos obtenidos no son tan claros, ya que no se conoce el tiempo del estado portador. *Blastocystis* spp, se ha evidenciado en pacientes con síntomas gastrointestinales, diarrea, dolor abdominal, flatulencia, vómito, estreñimiento, fatiga, colitis, náuseas, distensión abdominal, pero también en pacientes asintomáticos (Coyle et al., 2012).

2.3.6. Rol patogénico: Existe una gran controversia sobre *Blastocystis* spp, si es patógeno o un comensal, diferentes estudios realizados con ratas y gallinas demuestran la patogenicidad de este microorganismo y evidencian varios genotipos de *Blastocystis* spp. (Iguchi, 2003).

Estudios experimentales demostraron por medio de la Microscopía electrónica de barrido características de *Blastocystis* spp, se evidenciaron dos características en la estructura de este microorganismo uno con capa superficial gruesa y una delgada. En el 2008, se evidenciaron las características vacuolares en muestras de aislamientos sintomáticos, estas presentaban una característica particular, la superficie era más rugosa que las muestras aisladas de los asintomáticos (Awatif, 2013).

En un estudio realizado sobre los cambios morfológicos de *Blastocystis spp.* aislados de pacientes sintomáticos y asintomáticos, permitió observar mediante microscopía electrónica de transmisión diversos morfotipos: distribuidos según el grupo de la siguiente manera, en ambos grupos se encontró en mayor proporción la forma vacuolar, en los aislados de los pacientes asintomáticos se encontró la forma granular y aunque ésta se observó también en los aislados de pacientes sintomáticos no tuvo la misma frecuencia. Sin embargo, lo más relevante de esta investigación fue que se pudo definir dos tipos de formas ameboides, las cuales sólo fueron encontradas en los pacientes sintomáticos, éstas formas eran irregulares y polimórficas con pseudópodos, pero se

diferenciaban entre sí por el tamaño y ubicación de sus vacuolas, el primero presentaba una gran vacuola central llena de gránulos pequeños electrodensos y con actividad a nivel de los ácidos nucleicos y el segundo reveló múltiples vacuolas dentro de un cuerpo central, con un citoplasma que contenía filamentos de gránulos electrodensos que se asemejaban al retículo endoplásmico rugoso, lo que les permitió sugerir que presentaba una activa síntesis de proteínas. La superficie de la forma ameboide que rodeaba el parásito mostró un grosor desigual. Lo anterior permitió a los investigadores concluir que la forma ameboide podría ser un indicador de la patogenicidad de *Blastocystis* spp, o contribuir a la patogenicidad y ser la responsable de los síntomas que se observan en los pacientes (Tan, 2009; 2006).

En un estudio descriptivo se señala como factor de virulencia a los inhibidores de la proteasa, la cisteína proteasa se caracteriza por presentar residuos de cisteína y tener efectos citopáticos en células hospederas, causando la degradación de las proteínas de la matriz extracelular. Sin embargo, la totalidad de los factores de virulencia de este protozoo todavía no están claros (Sio et al., 2006; Tan 2006).

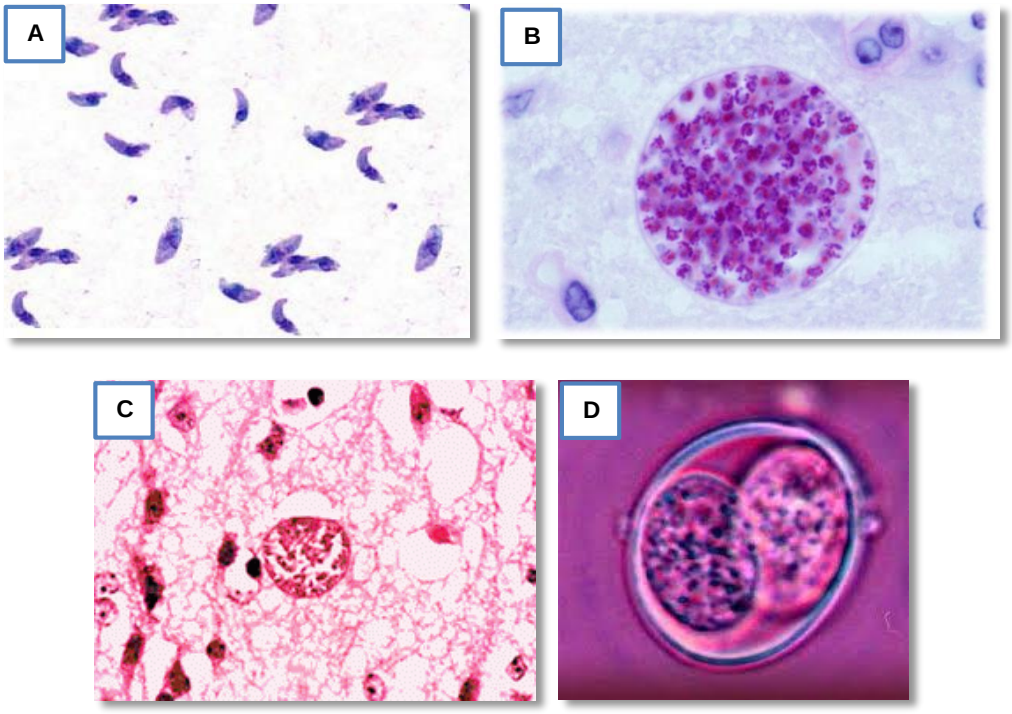
Las características genéticas se evidenciaron por medio de la prueba PCR de *Blastocystis spp.* de muestras de animales como cerdos y vacas, la prueba confirmatoria se realizó a través del análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción ó RFLP por sus siglas en inglés, evidenciándose que, en las muestras examinadas, los subtipos de *Blastocystis* spp. presentes, eran de origen zoonótico, esto corrobora la presencia de este microorganismo en diversos animales, siendo así un foco infeccioso para humanos y otros animales (Sio et al., 2006).

2.4. *TOXOPLASMA GONDII*

Toxoplasma gondii es un coccidio tisular intracelular obligado, de distribución cosmopolita, del Phylum Apicomplexa. Se estima que infecta de manera crónica aproximadamente a un tercio de la población humana y la prevalencia de infección oscila entre 10% - 90%, con una mayor incidencia en áreas tropicales con condiciones

ambientales y culturales que favorecen la transmisión; es una zoonosis de relevancia, puede infectar casi a cualquier mamífero de sangre caliente, terrestres, acuáticos y aves. Los felinos son los hospederos definitivos. La infección primaria es asintomática en un 90% de los casos, y habitualmente deja inmunidad no estéril a lo largo de la vida del hospedero. La infección puede asociarse a severas complicaciones en los principales grupos en riesgo: Sujetos inmunocomprometidos, mujeres embarazadas, fetos y recién nacidos, pacientes con toxoplasmosis congénita asintomática (Pittman & Knoll, 2015; Dzib-Paredes et al., 2016).

Figura 7. Formas de *Toxoplasma gondii.* A). Taquizoítos B). Quiste C) Bradizoíto. D). Ooquiste esporulado.



Fuente: https://toxoplasmosisyperfildetorch.wordpress.com/

2.4.1. Morfología: Existen tres estadios infecciosos de *T. gondii* (Figura 7) para todos los hospederos: esporozoítos (en ooquistes esporulados como forma resistente al medio ambiente), taquizoítos (individualmente o en grupos y con multiplicación rápida) y bradizoítos (en quistes tisulares y con multiplicación lenta) (Dubey & Lappin, 1998).

- Ooquiste y esporozoíto: Los ooquistes sin esporular son subesféricos a esféricos y miden de 10 a 12 µm de diámetro, mientras que los esporulados son subesféricos a elipsoidales y miden de 11 a 13 µm de diámetro. Cada ooquiste esporulado contiene dos esporoquistes elipsoidales de 6 a 8 µm y cada uno de estos contiene cuatro esporozoítos en su interior. Los esporozoítos miden 2 x 6-8 µm con un núcleo subterminal y presentan abundantes micronemas, roptrias, gránulos de amilopectina y lípidos. El número de lípidos es superior al presente en los taquizoítos y bradizoítos (Jones & Dubey, 2010).
- Taquizoíto: Miden aproximadamente 2 x 6 µm y tienen forma de media luna, con un extremo anterior conoidal y un extremo posterior redondeado. En su estructura contienen diversas organelas como mitocondrias, complejo de Golgi, ribosomas, roptrias, retículo endoplasmático rugoso y liso, cuerpos de inclusión, película protectora, microtúbulos subpeliculares, anillos apicales, anillos polares, conoide, micronemas, microporo, gránulos densos, gránulos de amilopectina (a veces ausentes) y apicoplasto. El núcleo está situado hacia el área central de la célula y contiene agregados de cromatina y un nucleolo central (Dubey, 2010).
- Bradizoíto: Se encuentran dentro de los quistes tisulares de diverso tamaño. Los quistes pequeños (jóvenes) miden 5 µm de diámetro y contienen sólo dos bradizoítos, y los quistes grandes (viejos) contienen cientos de organismos en su interior. Los quistes tisulares en cerebro son esferoidales, de hasta 70 µm de diámetro, mientras que los intramusculares son elongados y de hasta 100 µm de largo. La pared elástica y delgada encierra cientos de bradizoítos con forma de media luna, cada uno de aproximadamente 7 x 1.5 µm de tamaño (Jones & Dubey, 2010). La estructura del bradizoíto difiere levemente del taquizoíto; sin embargo, a diferencia del esporozoíto y del taquizoíto, este carece de lípidos y el número de roptrias y gránulos densos es inferior, mientras que el número de micronemas y gránulos de amilopectina es

superior. Los bradizoítos son más delgados, tienen un núcleo posterior y son menos susceptibles a la destrucción por enzimas proteolíticas (Dubey, 2010).

2.4.2. Taxonomía:

La clasificación inicial del género Toxoplasma se basó en el tipo de hospedero. Así se tuvo nueve especies: *T. alencari, T. bahiensis, T. brumpti, T. colubri, T. gondii, T. hammondi, T. pardalis, T. ranae y T. serpai*. Luego, en los años 30 se observó que los ciclos biológicos y las características inmunológicas de todas estas especies eran idénticos, por lo que se les agrupó bajo una misma especie: *T. gondii* (Gómez, 2004). *T. gondii* se incluye dentro del Phylum Apicomplexa, Clase Sporozoea, Subclase Coccidia, Orden Eucoccidida, Suborden Eimeriina, Familia Sarcocystidae y Subfamilia Toxoplasmatinae (Petersen & Dubey, 2001).

Tabla 4. Taxonomía de *Toxoplasma gondii***.**

Dominio	Eucariota
Reino	Protista
Super grupo	SAR o Harosa
Super filo	Alveolata
Filo	Apicomplexa
Clase	Sporozoasida
Subclase	Coccidiasina
Orden	Eimeriorina
Familia	*Toxoplasma*tidae
Género	*Toxoplasma*
Especie	*Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908)

Fuente: Tomado de Bahia-Olivera, Gomez-Marín, & Shapiro (2017)

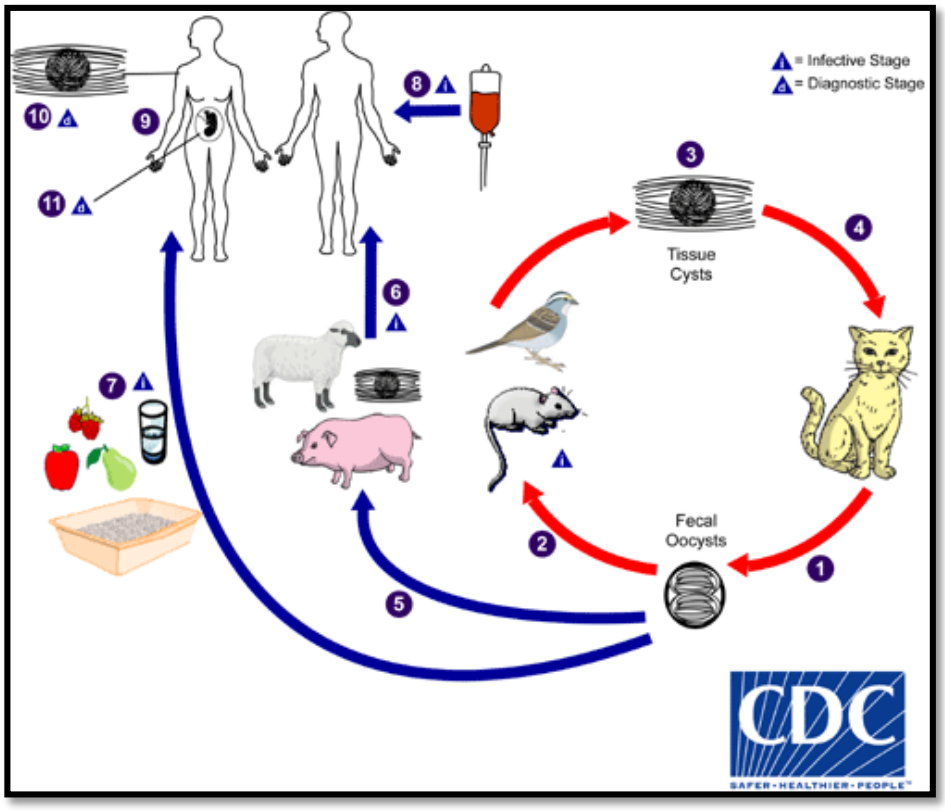
2.4.3. Ciclo biológico**.** El ciclo biológico comprende tres fases (Figura 8): la enteroepitelial (en hospederos definitivos), la extraintestinal (en hospederos intermediarios y definitivos) y la esporogónica, que ocurre en el medio ambiente (Dubey, 2010).

Los félidos domésticos y salvajes son los hospederos definitivos. En ellos se llevan a cabo las etapas sexuales y asexuales del ciclo biológico de *T. gondii*, por lo que constituyen también los principales reservorios. Los gatos se infectan habitualmente al ingerir carne contaminada de aves y roedores con quistes tisulares, y con poca frecuencia a través de ingesta de ooquistes. Los félidos infectados (una gran mayoría asintomáticos) pueden eliminar hasta 1 millón de ooquistes/día, no esporulados, 7 - 15 días después de la exposición. En el transcurso de días a semanas, los ooquistes esporulan en un medio ambiente adecuado (cálido, con humedad); en jardines, cajas de arena, pueden permanecer infectantes durante meses. En el humano y múltiples hospederos intermediarios (mamíferos, aves y otros animales de sangre caliente), después de la ingesta de quistes con bradizoítos u ooquistes con esporozoítos, los parásitos invaden las células de la mucosa del tracto digestivo, se diferencian a taquizoítos y se multiplican localmente antes de diseminarse por vía sanguínea o linfática a otros órganos.

Invaden de manera activa casi cualquier célula, con la formación de una vacuola parasitófora a partir de la membrana citoplásmica del hospedero. Después de unos ciclos de multiplicación rápida (por endodiogenia) y lisis de las células invadidas, en órganos inmunoprivilegiados (músculo, corazón, cerebro, retina, testículos, entre otros), los taquizoítos se diferencian en bradizoítos dentro de las vacuolas parasitarias, y estas se convierten en quistes intracelulares que pueden permanecer latentes mientras la respuesta inmune permanezca estable (Mercier & Cesbron-Delauw 2015).

Los ooquistes sobreviven en el medio ambiente durante meses y son resistentes a desinfectantes, congelación y desecación. Temperaturas de 70 °C o mayores los destruyen.

Figura 8. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii.*



Fuente: www.cdc.gov

2.4.4. Caracterización Molecular: *T. gondii* es un parásito inusual debido a su amplia gama de hospederos y por ser una sola especie en el género. Antes del desarrollo de marcadores genéticos se realizaron numerosos estudios en ratones para agrupar los aislados de *T. gondii* según su patogenicidad. Durante los años 80 y 90 se desarrollaron métodos para el reconocimiento de las diferencias genéticas entre los aislados de *T. gondii* procedentes de humanos y animales (Darde et al., 2007), clasificándolos en tres linajes o tipos genéticos (I, II, III), donde los aislados del tipo I pueden ser 100% letales para ratones, independientemente de la dosis, mientras que los tipos II y III son generalmente avirulentos para esta especie (Pena et al., 2006).

El genoma de *T. gondii* es haploide con un total de 14 cromosomas, compuesto por 7793 genes y 63 495 144 pares de bases (Khan et al., 2007).

2.4.5. Distribución geográfica: Recientemente, científicos norteamericanos analizaron muestras de ADN de *T. gondii* encontradas alrededor del mundo, concluyendo que todas las cepas son descendientes de un antepasado común que existió hace 10 millones de años y que dio origen a cuatro grupos: dos en Sudamérica, uno en Norteamérica y uno de distribución mundial. Hace aproximadamente un millón de años, la materia genética de estos cuatro grupos antiguos fue redistribuida entre 11 grupos de *T. gondii*, los que a su vez dieron origen a las 46 cepas conocidas en la actualidad (Rosenthal, 2008). La infección por *T. gondii* en el ser humano y en los animales se encuentra ampliamente distribuida (Dubey, 2010). Se estima que el 60% de la población humana mundial presenta títulos de anticuerpos contra *T. gondii* (Pappas et al., 2009). En Estados Unidos y Gran Bretaña se estima una seroprevalencia entre 16 y 40% y en Europa y Latinoamérica entre 50 a 80% (Barriga, 1997). En Cuba se encontró una prevalencia de 25 a 30% en los años 70, mientras que en la actualidad oscila entre 50 a 75%, de acuerdo al área geográfica, inmunodiagnóstico empleado y edad (Entrena, 2011).

2.4.6. Manifestaciones clínicas: La toxoplasmosis clínica felina es poco frecuente, no obstante, su presentación se ha descrito de forma intestinal, encefálica y ocular, así como generalizada. También puede estar asociada con la terapia glucocorticoide (Dubey & Lappin, 2000) y con infecciones concomitantes como *Bartonella* spp, virus de inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la leucemia felina (VLFe) causantes de inmunosupresión (Dorny et al., 2002) y virus de la peritonitis infecciosa felina (PIF) (Dubey y Lappin, 2000). Los signos clínicos generales en los gatos con toxoplasmosis incluyen fiebre alta (40.0 a 41.7 ºC) (Lindsay et al., 1997) e intermitente, pérdida de peso, letargia (Dubey & Lappin, 2000), emaciación (Salant & Spira, 2004) y anorexia. Cuando existe compromiso respiratorio, la disnea, polipnea (Dubey, 2010), estornudos y la descarga nasal (Salant & Spira, 2004) son los signos más evidentes.

En el compromiso digestivo se pueden presentar diarreas, principalmente en gatos jóvenes (Acha & Szyfres, 2003), ictericia y dolor a la palpación abdominal atribuibles a la hepatitis, pancreatitis (Dubey, 2010) y a la colangiohepatitis, así como vómitos y abdomen abultado por la hepatomegalia y la ascitis (Dubey & Lappin, 2000). Al existir

compromiso neuronal, los hallazgos señalan hipotermia, ceguera parcial o total, aumento en el comportamiento de afecto, estupor, falta de coordinación, llanto atípico, contracción auditiva, movimientos en círculos, tortícolis, cabeza como flotando, convulsiones (Dubey, 2010), parálisis (Salant & Spira, 2004); así como somnolencia prolongada, llanto continuo por la encefalitis, hiperestesia a la palpación muscular, rigidez a la marcha, cojera y déficit neurológico (Dubey & Lappin, 2000). Además, dolor en las articulaciones y debilidad atribuible a la inflamación periarticular. En gatos infectados por *T. gondii* con compromiso ocular, se pueden encontrar midriasis, anisocoria, hifema y reflejo pupilar lento a la luz (Dubey, 2010).

2.5. *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.

2.5.1. Generalidades: *Cryptosporidium* es un género de protistas parásitos del filo Apicomplexa al que se le asocia con una enfermedad llamada criptosporidiosis diarreica en seres humanos. *Cryptosporidium* es capaz de completar su ciclo vital dentro de un único anfitrión, puesto que los quistes se excretan en las heces y son susceptibles de transmisión a un nuevo anfitrión. La criptosporidiosis es típicamente una enfermedad aguda de corta duración, pero la infección puede ser grave y continuada en niños y en pacientes inmunocomprometidos. El parásito se transmite en el medio ambiente mediante quistes resistentes (ooquistes) que, una vez ingeridos, desenquistan en el intestino delgado y dan lugar a la infección de los tejidos epiteliales intestinales (Romero, 1993).

El género *Cryptosporidium*, constituido por diversas especies, puede causar infección gastrointestinal en una amplia variedad de mamíferos, incluido el hombre. Está asociado a morbilidad y mortalidad significativas tanto en países desarrollados como subdesarrollados (Caccio, 2005). El ooquiste, su estadio infectivo, se elimina en grandes cantidades con las heces del hospedador. Su resistencia a condiciones adversas y a los tratamientos de potabilización del agua permiten su diseminación y persistencia en el ambiente (Smith, 2005).

Cryptosporidium produce diarreas de intensidad y duración variables en función de factores inherentes al hospedador (edad, estado inmunológico) y al parásito (dosis infectiva, fuente de infección, vida media de los ooquistes) (Smith, 2007). En humanos inmunocompetentes se presenta un cuadro de diarrea acuosa y voluminosa con moco, sin sangre ni leucocitos, tras una semana de incubación. También se han informado infecciones asintomáticas (Fayer, 2008). La duración del cuadro clínico es de aproximadamente 12 días y la eliminación de ooquistes, que suele ser intermitente, puede persistir aun en la etapa de convalecencia (Chappell et al., 1996). En sujetos inmunocomprometidos, sobre todo en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), ocasiona cuadros clínicos más graves y duraderos que en las personas inmunológicamente sanas (Méndez et al., 1994). Las manifestaciones clínicas dependerán básicamente del recuento de linfocitos T CD4+/ mm3 (Chen, 2002). En estos pacientes se pueden presentar formas clínicas infrecuentes de criptosporidiosis extraintestinal (Dunand et al.,1997; Hunter et al., 2002; Morpeth, 2006).

Los terneros menores de 30 días constituyen una de las principales fuentes de contaminación ambiental con ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, la principal especie zoonótica del género (Tzipori, 2002). Este parásito ha emergido como uno de los enteropatógenos más importantes asociados con diarrea neonatal bovina junto con rotavirus, coronavirus, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. La infección puede ser asintomática o cursar con cuadros clínicos de variada intensidad que van desde la diarrea difusa e intermitente hasta la diarrea acuosa profusa con deshidratación concomitante (García et al., 2000). Hasta el momento no existe quimioterapia totalmente eficaz para la diarrea producida por *Cryptosporidium* (Caccio, 2006). A pesar de los numerosos intentos de la industria farmacéutica en desarrollar un antiparasitario efectivo contra *Cryptosporidium*, la infección gastrointestinal y sus consecuencias clínicas continúan siendo un importante problema en materia de salud pública, sobre todo en los países subdesarrollados.

2.5.2. Taxonomía:

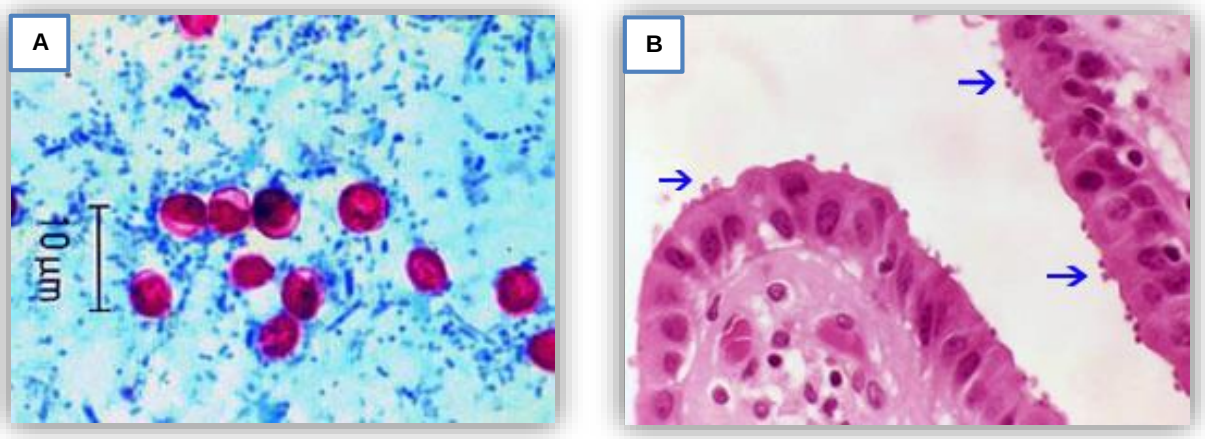
Tabla 5. Taxonomía de *Cryptosporidium* spp.

Reino	Protista
Super filo	Alveolata
Filo	Apicomplexa
Clase	Conoidasida
Subclase	Coccidiasina
Orden	Eucoccidiorida
Suberorden	Eimeriorina
Familia	*Cryptosporidiidae*
Género	*Cryptosporidium*
Especie	*Cryptosporidium* spp (Nicolle & Manceaux, 1908)

Fuente: Tomado de Fayer (2009)

2.5.3. Morfología: La forma diagnóstica en materia fecal de *Cryptosporidium* corresponde a la forma de Ooquiste, que aparece como una estructura esférica o ligeramente ovoidal que mide de 4 a 6 micras de diámetro (Figura 9). Cuando se observa con microscopía de contraste de fases se ve que posee una doble pared y una estructura interna formada por 4 esporozoitos vermiformes y cuerpos residuales que no son claramente visibles. Pueden observarse varios tipos de ooquistes: ooquistes no esporulados y ooquistes esporulados, en los cuales en muchos casos es posible observar los esporozoitos como líneas transversales claras y el cuerpo residual como una mancha oscura excéntrica cuando están teñidos con Ziehl-Neelsen modificado (Tay, 1993).

Figura 9. Morfología de *Cryptosporidium* spp. A). Ooquistes B). En epitelio de vesícula.



Fuente: http://www.facmed.unam.mx

2.5.4. Epidemiología: Las especies del género *Cryptosporidium* son de distribución cosmopolita. El principal mecanismo de infección es la ingestión de ooquistes esporulados por contacto directo o indirecto con el hospedador. Este género presenta características epidemiológicas particulares: la dosis infectiva es baja (1 a 10 ooquistes), los ooquistes no requieren maduración exógena una vez eliminados, presentan notable resistencia frente a condiciones adversas y se dispersan en el ambiente con la consecuente contaminación del agua destinada al consumo humano (Basualdo et al., 2000).

El género *Cryptosporidium* afecta a todas las especies de mamíferos, peces, reptiles y aves (Fayer, 2004). Las especies de *Cryptosporidium* relacionadas con formas endémicas y epidémicas de la infección son *C. hominis y C. parvum*. Estas especies son responsables del 90% de los casos de criptosporidiosis en humanos (Caccio, 2006). *C. parvum* es considerada la especie con mayor potencial zoonótico del género, y los terneros no destetados su principal reservorio (Smith, 2005; Xiao, 2009). La presencia de *Cryptosporidium* spp. en la materia fecal de terneros ha sido estudiada en distintos lugares del mundo. Se han establecido prevalencias que oscilan entre 0,9% y 100% (Castro et al., 2002; Del Coco, 2008; Quílez et al., 1996; Uga et al., 2000; Wade, 2000). Estos animales han sido identificados como agentes causales de brotes de

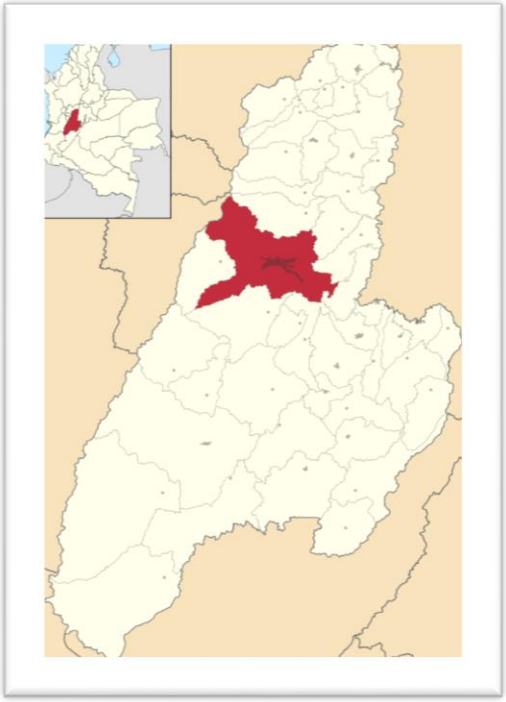
criptosporidiosis transmitida por consumo de agua y alimentos contaminados (Caccio, 2006).

3. METODOLOGÍA

3.1. ÁREA DE ESTUDIO

El muestreo de material vegetal (hortalizas y frutas de consumo humano) se realizó en la cuidad de Ibagué (casco urbano), capital del departamento del Tolima (Figura 10), localizada a 1285 metros sobre el nivel del mar con una temperatura media de 24ºC. Su área municipal cubre 1498 Km² los cuales se distribuyen en una zona montañosa que se extiende por la cordillera central y una amplia zona plana conocida como la meseta de Ibagué. El área municipal se encuentra regada por los ríos Alvarado, Cocora, Coello, Toche, Tochecito, además de otras corrientes menores. Ibagué cuenta con una población de 450.785 habitantes; el 2,41% pertenece al área urbana y 97,59% al área rural. El área urbana está dividida en 13 comunas y 445 barrios (WEB - Alcaldía Municipal de Ibagué, 2019).

Figura 10. Ubicación geográfica, área de estudio, cuidad Ibagué – Tolima, Colombia.



Fuente: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/1/19/Colombia

3.2. SELECCIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO

Para el muestreo de material vegetal, se escogieron trece de los puntos de venta más populares distribuidos en plazas de mercado, supermercados de cadena y tiendas fruver de la cuidad de Ibagué (Tabla 6). Posteriormente, se realizó la compra de un total de 100 muestras entre frutas y hortalizas frescas vendidas en cada localidad; a partir del 18 de enero del 2017 hasta el 3 de junio del 2018. Con el fin de obtener muestras cultivadas en periodos climáticos variables.

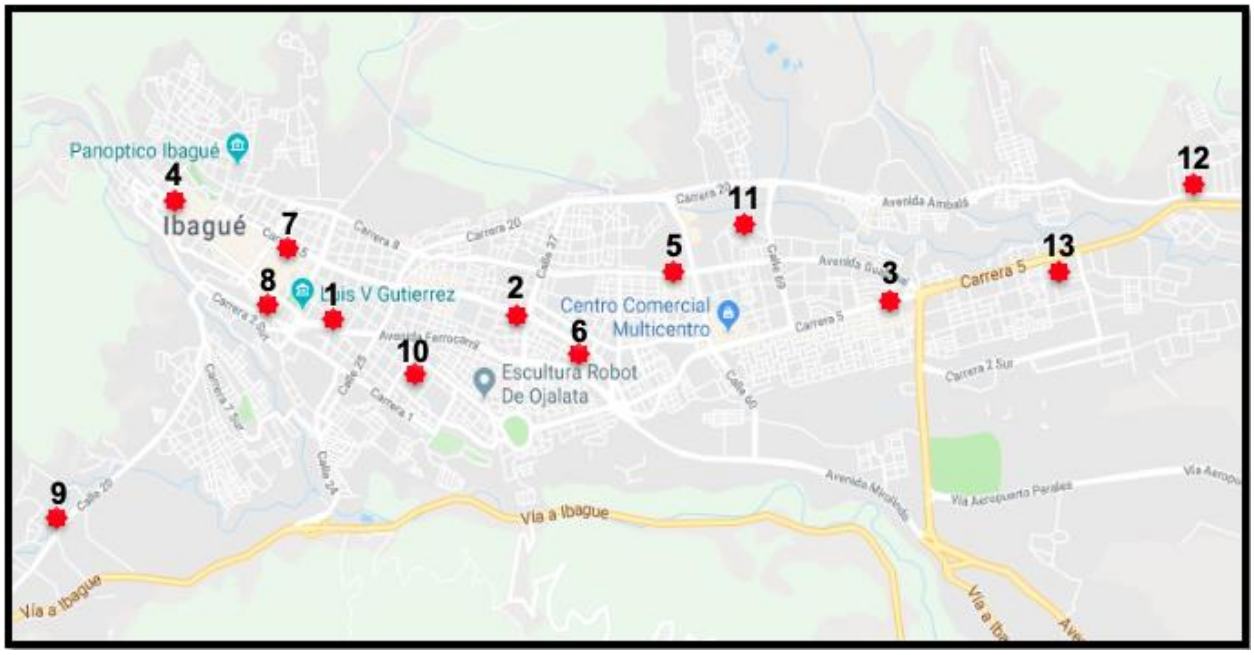
Tabla 6. Puntos de muestreo de material vegetal – Casco urbano, ciudad de Ibagué.

	Fecha de recolección	**Localidad**	**Ubicación**
1	18/01/17	Plaza de la 21	Cra. 4 #21-94
2	9/03/17	Super inter 37	Calle 37 Carrera 5 Esq.
3	10/09/17	Supermercado Éxito	Cra. 5 #8060
4	5/12/17	Plaza de la 14	Cl. 14 #1-6
5	27/12/17	Super. Mercacentro nº 4	Av. Guabinal #6053
6	18/01/18	Fruver la Granja 40	Cra. 5 #40-42
7	31/01/18	Supermercado Popular	Cl. 17 #5-1
8	7/02/18	Supermercado Metro	Calle 19 Nº 3 - 52
9	14/02/18	Fruver Boquerón	Calle 20 # 22 a sur - 135
10	27/03/18	Plaza de la 28	Cra. 4 #28a-72
11	26/04/18	Supermercado Olímpica	Av. Ambalá #45-2
12	8/05/18	Surti plaza salado	Cra. 9 #111
13	22/05/18	Plaza del Jardín	Cl. 99 #5-56
14	24/05/18	Plaza de la 14	Cl. 14 #1-6
15	3/06/18	Plaza de la 21	Cra. 4 #21-94

Fuente: Autor.

3.2.1. Obtención de la muestra: Se colectaron un total de 100 muestras, distribuidas en 7 vegetales que se caracterizan por su mayor consumo y comercialización en la cuidad; lechuga (variedad lisa y crespa), apio, cebolla larga, zanahoria, cilantro y fresas. La toma se realizó en 15 visitas a los lugares establecidos para el muestreo del material vegetal (Tabla 6). En los 13 puntos de muestreo (Figura 11), se tomaron 500 g de cada una de las 7 hortalizas; estos productos se encontraban en perfecto estado macroscópico al momento del muestreo. Cada producto se empacó en las bolsas entregadas por el vendedor o supermercado para evitar el contacto entre las mismas, y fueron llevadas al laboratorio de parasitología tropical de la Universidad del Tolima (LIPT). Posteriormente, cada muestra se pasó a una bolsa de cierre hermético estéril, las cuales se marcaron con el número consecutivo de estudio y se diligenció el formato de recolección en el cual se tiene información pertinente al sitio de muestreo, fecha, hora y resultados obtenidos (Anexo A).

Figura 11. Ubicación de los 13 puntos de muestreo – Casco urbano cuidad de Ibagué.



Fuente: Google Maps (Modificado por autor)

3.3. CONTROLES POSITIVOS

Siendo el objetivo general determinar la presencia de 4 especies de parásitos en hortalizas por medio de métodos moleculares; fue necesario obtener ADN de buena calidad como control positivo para cada uno de los procedimientos del trabajo.
Para los parásitos *Blastocystis* spp. y *Giardia duodenalis*, se realizó un convenio con el laboratorio clínico Naizir, quienes entregaron muestras coprológicas con diagnóstico de microscopía positivo para los dos parásitos, estas fueron recogidas y almacenadas a 4ºC hasta su posterior concentración y extracción de ácidos nucleicos en el laboratorio. El trabajo con las muestras donadas por el laboratorio se realizó con el consentimiento informado por parte de los pacientes directamente relacionados (Anexo B).

El ADN de *Toxoplasma* empleado como control positivo fue la cepa RH de *T. gondii* a una concentración de 1pg/µL, la cual fue donada por parte del Doctor Ricardo Wagner Almeida Vitor del departamento de parasitología de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG) de Brasil y el grupo de parasitología (SLRN) del Instituto nacional de salud - Bogotá.

Finalmente, el control positivo empleado para *Cryptosporidium* spp*.* (ADN), fue donado por el laboratorio de Estudio en Parasitología y Micología Molecular (GEPAMOL) de la universidad del Quindío - Armenia.

3.4. CONCENTRACIÓN DE QUISTES A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL

Para garantizar la eficiencia de las metodologías y obtener la mayor cantidad de quistes viables, la concentración de los mismos se llevó a cabo de la siguiente manera: Inicialmente, se tomaron las bolsas estériles que contenían el material vegetal, y se les agregó 200 ml de agua desionizada, fueron agitadas manualmente por 10 min, asegurándose de impregnar toda la muestra con el agua estéril, seguido a esto, se dejan las bolsas en un shaker por 15 min en agitación constante. Posteriormente, se rescatan los 200 ml de agua producto del lavado de las hortalizas, pasándola a tubos falcon de 50

ml, a través de una gasa sencilla para limpiar la muestra de partículas grandes o suciedad. Finalmente se centrifugan los tubos a 4000 rpm por 3 min, con el fin de descartar sobrenadantes y reunir el sedimento en un solo falcon. Este sedimento fue empleado para la concentración de quistes utilizando el método de flotación con Sulfato de Zinc, modificado (Faust et al., 1938) descrito en el Anexo C.

3.5. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.5.1. Lavado y ruptura de quistes: una vez finalizada la concentración de quistes por el método de flotación de Faust es necesario realizar un lavado a las muestras, debido al sulfato de zinc, el cual puede interferir en el protocolo de extracción y posterior detección molecular, debido al exceso de sales. Así mismo, debido a la gruesa pared quística, con capas filamentosas y membranosas que le brindan la capacidad de resistir a condiciones medioambientales, es necesario realizar una previa ruptura de los quistes. Estos dos procedimientos se realizaron bajo las siguientes condiciones:

- *Lavado:*
    1. Centrifugar el pellet resultado de la flotación de Faust, por 5 minutos a 14000 rpm y eliminar el sobrenadante.
    2. Resuspender en 500 µl de H_2Odd y centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm. Eliminar el sobrenadante. (Repetir este paso dos veces).

- *Ruptura por choque térmico:*
    1. Resuspender el pellet en 100 µl de buffer de lisis (EDTA, NaCl, H_2Od, SDS).
    2. Someter la muestra a tres ciclos, de congelamiento en nitrógeno líquido y descongelamiento en baño de María a 65 ºC.

3.5.2. Digestión enzimática: Posterior a la ruptura y lisis de quistes, se adiciona a la muestra 200 µl de H_2Odd (Volumen final 300 µl), y se realiza la digestión con proteinasa K a una concentración de trabajo de 200 µg/ml (stock 20 µg/µl). Poner en digestión a 37 ºC durante toda la noche o incubando a 56ºC durante 1 hora.

3.5.3. Extracción y purificación de ADN: La extracción se realizó con solventes orgánicos aplicando el método Fenol - Cloroformo - Alcohol Isoamílico (FCAI) a un volumen de 300 µl (Anexo D). La purificación, realizando una digestión con ribonucleasa A (50 µg/ml) durante 1 hora a 37ºC y repitiendo el procedimiento de extracción (FCAI) (Sambrook, 1989).

3.6. DETECCIÓN MOLECULAR

3.6.1. *Giardia duodenalis*: Para la detección de este parásito a partir del DNA extraído de las muestras, se llevó a cabo la amplificación del gen β-giardina (831 pb) mediante una PCR semianidada. En la primera reacción se amplifica un fragmento de 753 pb del gen de la β-giardina utilizando el iniciador G7 y G759. En la segunda reacción de PCR se amplifica un fragmento de 384 pb del mismo gen utilizando los iniciadores G376 y G759 (Tabla 7), (Caccio *et al.,* 2002).

Tabla 7. Primers para detección de *Giardia duodenalis.*

Primera ronda	**Primers**		**Secuencia (5'– 3')**
	Primer F	G7	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC
	Primer R	G759	GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC
Segunda ronda	**Primer F**	G376	AACGACGCCGCGGCTCTCAGGAA
	Primer R	G759	GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC

Fuente: Caccio *et al.* (2002)

Tabla 8. Mezcla de reacción para PCR de *Giardia duodenalis.*

Reactivo	**Concentración**	**Volumen (µl)**
Buffer 10x	1X	2
$MgCl_2$	1,5mM	1,2
dNTP's	200 µM	1,6
Primer 1	20 pmol	0,8
Primer 2	20 pmol	0,8
Taq - Polimerasa	1U	0,1

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)
H_2O	-	11,5
ADN		2

Fuente: Autor – LIPT

Tabla 9. Perfil térmico para PCR de *Giardia duodenalis.*

Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	95ºC	5 min
2	94ºC	30 seg
3	65ºC	30 seg
4	72ºC	60 seg
5	35 ciclos desde el paso 2	
6	72ºC	7 min
7	4ºC	∞

Fuente: Autor - LIPT

3.6.1.1. PCR-RFLP - genotipos de *Giardia duodenalis.* Los productos de PCR fueron sometidos a digestión, para el diagnóstico de genotipos de *Giardia duodenalis*, utilizando las enzimas de restricción: *Hae III* (para el fragmento de 753pb) y *Hha I* (para el fragmento de 384 pb). Esta se realizó con 10 µl de amplicón y buffer de la enzima en un volumen final de 20 µl; la mezcla se dejó en digestión a 37ºC durante 4 horas (Caccio et al., 2002).

Figura 12. Fragmentos del gen de la β-giardina obtenidos al realizar el corte con las endonucleasas de restricción *Hae* III y *Hha* I.

Genotipo	Tamaño del fragmento del gen amplificado	Enzima (número de sitios de restricción)	Tamaño de los fragmentos esperados (pb)	Perfil de las bandas para el diagnóstico de los genotipos (pb)
A	Beta giardina 753 pb	*Hae* III (4)	202, 201, 150, 126, 74	200, 200, 150, 130
B	Beta giardina 753 pb	*Hae* III (5)	202, 176, 150, 117, 84, 24	200, 180, 150, 120, 80
C	Beta giardina 753 pb	*Hae* III (6)	286, 150, 126, 102, 70, 15, 4	290, 150, 130, 100, 70
D	Beta giardina 753 pb	*Hae* III (3)	346, 286, 117, 4	350, 290, 120
A1	Beta giardina 384 pb	*Hha* I (3)	193, 104, 70, 17	190, 100, 70
AII/AIII	Beta giardina 384 pb	*Hha* I (3)	210, 70, 70, 34	210, 70

Fuente: Rodríguez et al. (2014)

3.6.2. *Blastocystis* spp: Se realizó una caracterización molecular, con la amplificación del gen de la pequeña subunidad del ARN ribosomal (SSU-rDNA), como blanco para este parásito según la literatura. Para la PCR general de *Blastocystis* spp, se utilizaron los primers diseñados y utilizados por Stensvold y colaboradores en el 2006, con un producto esperado de 310 pb. En la caracterización genética por subtipos se usaron los primers diseñados por Yoshikawa y colaboradores entre 1998 y 2004 (Yoshikawa et al., 2004).

Tabla 10. Primers para detección general de *Blastocystis* spp.

Primers		Secuencia (5'– 3')
Primer F	bl1400ForC	GGAATCCTCTTAGAGGGACACTATACAT
Primer R	bl1710RevC	TTACTAAAATCCAAAGTGTTCATCGGAC

Fuente: Stensvold et al. (2006)

Tabla 11. Primers para caracterización de subtipos de *Blastocystis* spp**.**

Subtipo	**Primers**		**Secuencia (5'– 3')**	**Producto esperado (pb)**
1	Primer F	SB83	GAAGGACTCTCTGACGATGA	351
	Primer R		GTCCAAATGAAAGGCAGC	
2	Primer F	SB340	TGTTCTTGTGTCTTCTCAGCTC	704

Subtipo	Primers		Secuencia (5'– 3')	Producto esperado (pb)
	Primer R		TTCTTTCACACTCCCGTCAT	
3	Primer F	SB227	TAGGATTTGGTGTTTGGAGA	526
	Primer R		TTAGAAGTGAAGGAGATGGAAG	
4	Primer F	SB337	GTCTTTCCCTGTCTATTCTTGCA	487
	Primer R		AATTCGGTCTGCTTCTTCTG	
5	Primer F	SB336	GTGGGTAGAGGAAGGAAAACA	317
	Primer R		AGAACAAGTCGATGAAGTGAGAT	
6	Primer F	SB332	GCATCCAGACTACTATCAACATT	338
	Primer R		CCATTTTCAGACAACCACTTA	
7	Primer F	SB155	ATCAGCCTACAATCTCCTC	650
	Primer R		ATCGCCACTTCTCCAAT	

Fuente: Yoshikawa et al. (2004)

Tabla 12. Mezcla de reacción para PCR general y caracterización (subtipos) de *Blastocystis* spp.

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)
Buffer 10x	1X	2
KCl	750mM	0,25
$MgCl_2$	25mM	1,2
dNTP's	2,5mM	1,6
Primer 1	2,5µM	0,8
Primer 2	2,5µM	0,8
Taq - Polimerasa	1U	0,1
H_2O	-	11,25
ADN		2

Fuente: Autor - LIPT

Tabla 13. Perfil térmico para PCR general y subtipos de *Blastocystis* spp.

General			Subtipos		
Ciclo	Temperatura	Tiempo	**Ciclo**	Temperatura	Tiempo
1	94ºC	5 min	**1**	94ºC	5 min
2	94ºC	1 min	**2**	94ºC	30 seg
3	60ºC	1 min	**3**	57ºC	30 seg
4	72ºC	1 min	**4**	72ºC	1 min
5	34 ciclos desde el paso 2		**5**	39 ciclos desde el paso 2	
6	72ºC	5 min	**6**	72ºC	7 min
7	4ºC	∞	**7**	4ºC	∞

Fuente: Autor - LIPT

3.6.3. *Toxoplasma gondii.* Se realizó la detección por medio de una PCR anidada (n-PCR), basada en el estudio original de Burg et al. (1989), modificado posteriormente por Jones et al. (2000). Al realizar el análisis comparativo con la secuencia del gen *B1* encontrada en el GenBank (AF179871) por medio del programa MEGA V7.0.21 se observó un nucleótido adicional (Citosina en la posición 11 del primer). Los primers anteriormente mencionados también fueron analizados con las herramientas bioinformáticas Nucleotide BLAST, PCR Products y Primer-BLAST. El protocolo fue ajustado en el laboratorio y se desarrolló la detección para las muestras del estudio con la combinación de primers que arrojaron mejores resultados. Se espera un producto de amplificación de 127 pb en la primera reacción (sólo se visualiza con buena cantidad de ADN) y 97 pb para la segunda reacción.

Tabla 14. Primers para detección de *Toxoplasma gondii.*

Primera ronda	**Primers**		**Secuencia (5'– 3')**
	Primer F	**Toxo N1**	**GGAACTGCATCCGTTCATGAG**
	Primer R	**Toxo C1**	**TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC**
	Primer F	Toxo N2	TGCATAGGTTGCAGTCACTG

	Primers		Secuencia (5'– 3')
Primera ronda	**Primer F**	**Toxo N1**	**GGAACTGCATCCGTTCATGAG**
	Primer R	**Toxo C1**	**TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC**
Segunda ronda	Primer F	Toxo N2 modificado	TGCATAGGTTGCCAGTCACTG
	Primer R	Toxo C2	GGCGACCAATCTGCGAATACA

Fuente: Jones et al. (2000). Modificado LIPT.

Tabla 15. Mezcla de reacción para PCR de *Toxoplasma gondii.*

Reactivo	Concentración	Volumen (µl)
Buffer 10x	1X	2
$MgCl_2$	1,5mM	1,2
dNTP's	2,5mM	1,6
Primer 1	1µM	0,8
Primer 2	1µM	0,8
Taq - Polimerasa	1U	0,1
H_2O	-	11,5
ADN		2

Fuente: Autor – LIPT

Tabla 16. Perfil térmico para PCR de *Toxoplasma gondii.*

Primera ronda		
Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	94ºC	5 min
2	94ºC	1 min
3	53ºC	1 min
4	72ºC	1 min
5	40 ciclos desde el paso 2	
6	72ºC	10 min
7	4ºC	∞

Segunda ronda		
Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	94ºC	5 min
2	94ºC	1 min
3	53ºC	30 seg
4	72ºC	30 seg
5	30 ciclos desde el paso 2	
6	72ºC	10 min
7	4ºC	∞

Fuente: Autor - LIPT

3.6.4. *Cryptosporidium* spp. Se realizó la detección por medio de una PCR anidada (n-PCR), con la amplificación del gen HSP70 y un producto esperado en la segunda ronda de 307 pb, basado en los primers del estudio de Rochelle et al. (1997). Las condiciones del perfil térmico y la mezcla de reacción se estandarizaron en el laboratorio.

Tabla 17. Primers para detección de *Cryptosporidium* spp.

Primera ronda	**Primers**		**Secuencia (5'– 3')**
	Primer F	cphsp2386	CTGTTGCTTATGGTGCTGCTG
	Primer R	cphsp2672	CCTCTTGGTGCTGGTGGAATA
Segunda ronda	Primer F	HSP70Cryp	ATGACATCATCTGAAGGTCC
	Primer R	HSP70Crip	TTAGTCGACCTCTTCAACAG

Fuente: Rochelle et al. (1997)

Tabla 18. Mezcla de reacción para PCR de *Cryptosporidium* spp.

Reactivo	**Concentración**	**Volumen (µl)**
Buffer 10x	1X	2
$MgCl_2$	3 mM	1,3
dNTP's	0,2 mM	1,5
Primer 1	0,2 mM	0,8
Primer 2	0,2 mM	0,8
Taq - Polimerasa	1U	0,1
H_2O	-	10,5
ADN		2

Fuente: Autor – LIPT

Tabla 19. Perfil térmico para PCR de *Cryptosporidium* spp.

Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	94ºC	5 min
2	94ºC	20 seg
3	58ºC	45 seg
4	72ºC	1 min
5	40 ciclos desde el paso 2	
6	72ºC	7 min
7	4ºC	∞

Fuente: Autor - LIPT

3.7. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

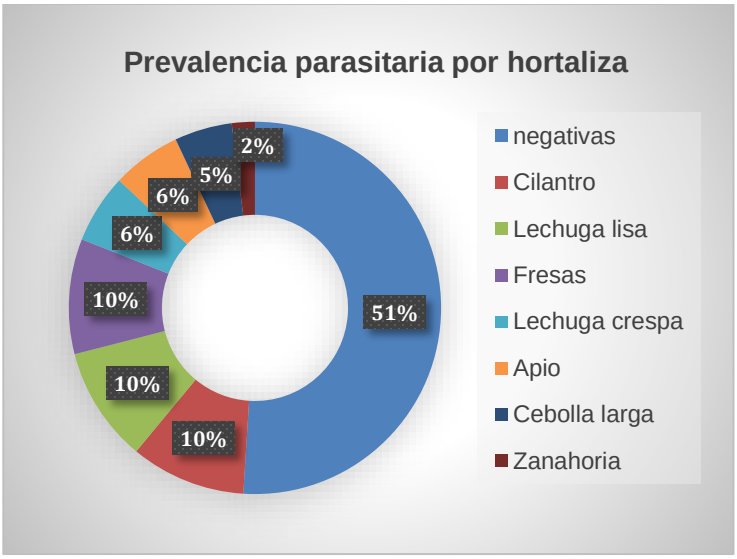
Se realizaron los corridos con electroforesis de acrilamida al 6% (Anexo E). Se eligió este tipo de gel por su alta sensibilidad para detectar los productos de PCR de las muestras, debido a la baja cantidad de ADN detectado en material vegetal. Para ello, 5µL de los productos de reacción de PCR para cada parásito se mezclaron con 1µl de buffer de carga (6X); se separaron en gel de poliacrilamida al 6% en una solución tampón al 1X de tris-ácido bórico-EDTA (TBE). Las condiciones de corrido fueron 80 voltios durante 40 minutos y se realizó la tinción con nitrato de plata. Finalmente, se tomó fotografía al gel resultante para el análisis. El tamaño de los fragmentos fue determinado utilizando marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

4. RESULTADOS

4.1. ESTANDARIZACIÓN DE METODOLOGÍAS

4.1.1. Concentración de quistes a partir de material vegetal: Se logró estandarizar una metodología para obtener quistes viables, permitiendo así detectar muestras positivas en los 7 tipos de hortalizas muestreadas (Figura 13). Esta metodología, se basó en realizar lavados con agua estéril, tanto manuales como mecánicos que permitieran la obtención de los quistes presentes en la parte exterior de las hortalizas; posteriormente, se reunió el sedimento obtenido por medio de centrifugación en un solo tubo, pasándolo previamente por una capa sencilla de gasa, con el fin de eliminar partículas grandes o suciedad; dicho sedimento, fue empleado para la concentración de quistes utilizando el método de flotación con Sulfato de Zinc, modificado (Faust et al., 1938) descrito en el Anexo C. Finalmente, el producto de la flotación, se sometió a la extracción de ADN y fue empleado para cada una de las PCR estandarizadas en la detección de los cuatro parásitos en estudio.

Figura 13. Representación gráfica de muestras positivas por tipo de hortaliza (Sobre 100 muestras).



Fuente: El autor.

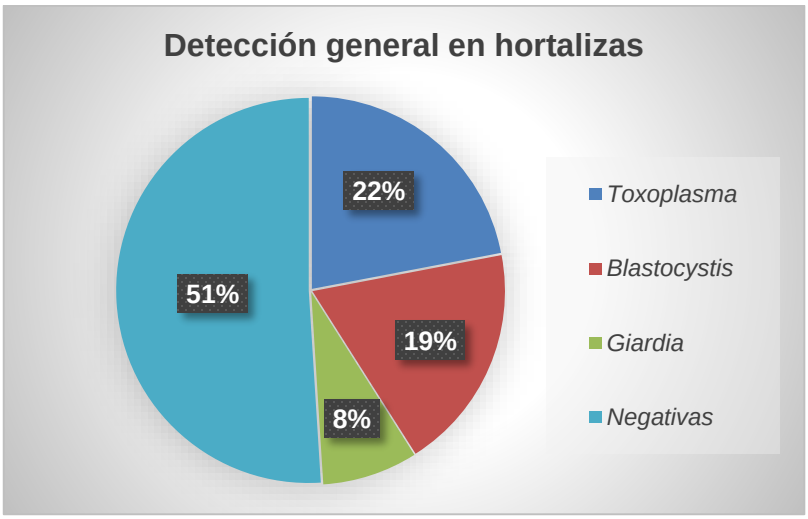
4.1.2. Estandarización de PCR: Se realizó un análisis informático para cada uno de los pares de primers usados en la detección molecular, con la herramienta “Nucleotide Blast”, del sitio web: National Center for Biotechnology Information (NCBI) a través del enlace:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome; encontrándose que los primers G7, G759, G376 presentan 61 secuencias parecidas (*Giardia duodenalis*), bl1400ForC – bl1710RevC con 105 (*Blastocystis* spp), N1, C1, N2, C2 con 66 (*Toxoplasma gondii*) y HSP70CrypFw - HSP70CripRv con 72 (*Cryptosporidium* spp). La alta homología en las secuencias fue el criterio clave para escoger estos primers en las detecciones moleculares de cada parásito en estudio (Anexo F). Posteriormente el perfil térmico usado por los autores para cada uno de los pares de primers descritos anteriormente, se sometió a prueba realizando modificaciones en temperaturas y número de ciclos, estandarizándolo en el Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, para mejorar la sensibilidad en las pruebas (Plasmado en la metodología).

4.2. DETECCIÓN MOLECULAR EN HORTALIZAS Y FRUTAS

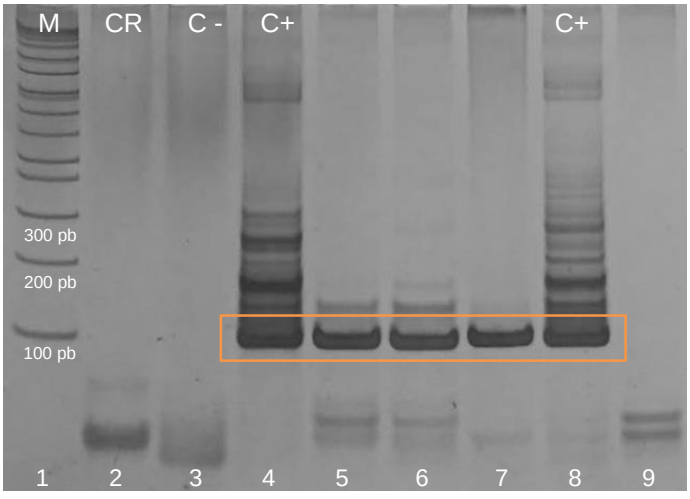
4.2.1. Detección general: Las 100 muestras obtenidas de material vegetal (Fresas, apio, cebolla larga, cilantro, zanahoria, lechuga crespa y lisa), fueron sometidas a la extracción de ácidos nucleicos y posteriormente a la PCR convencional, específica de cada parásito; obteniendo de ellas 49 muestras positivas y 51 negativas. En las muestras positivas se detectó la presencia de *Giardia duodenalis, Blastocystis* spp. y *Toxoplasma gondii,* encontrando una mayor prevalencia de *Toxoplasma* y en el caso de *Cryptosporidium* spp. ninguna muestra positiva. Los porcentajes de presencia parasitaria se observan en la figura 14.

Figura 14. Representación gráfica de los valores obtenidos en la detección general molecular de *Toxoplasma gondii, Blastocystis* spp*, Giardia duodenalis y Cryptosporidium* spp (100 muestras de hortalizas y frutas).



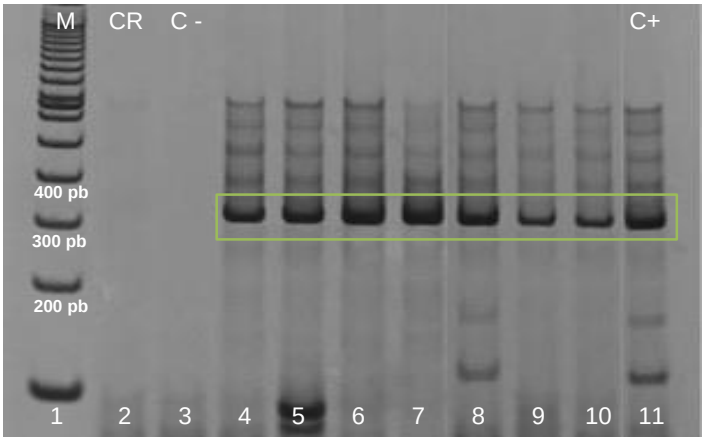
Fuente: El autor.

Figura 15. Visualización del producto de la segunda ronda de PCR (anidada) para detección general de *Toxoplasma gondii* en gel de poliacrilamida al 6%. En recuadro naranja, banda de 97pb obtenida usando los primers Toxo N2 - Toxo C2. M) Marcador de peso molecular 1kb plus; CR) Control de reacción; C-) Control negativo (Agua destilada); C+) Control positivo; canaletas 5-7: muestras positivas para *Toxoplasma.*



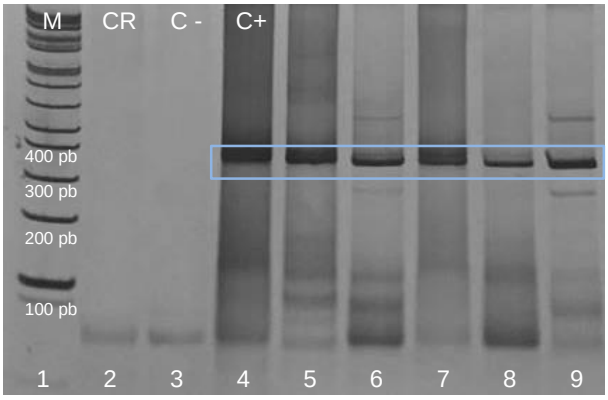
Fuente: El autor.

Figura 16. Visualización del producto de PCR para detección general de *Blastocystis* spp en gel de poliacrilamida al 6%. En recuadro verde, banda de 310 pb obtenida usando los primers bl1400ForC – bl1710RevC. M) Marcador de peso molecular 1kb plus; CR) Control de reacción; C-) Control negativo (Agua destilada); canaletas 4-10: muestras positivas para *Blastocystis;* C+) Control positivo.



Fuente: El autor.

Figura 17. Producto de la segunda ronda de PCR para detección general de *Giardia duodenalis.* En recuadro azul, banda de 384pb (Primers G376 y G759). M) Marcador de peso molecular 1kb plus; CR) Control de reacción; C-) Control negativo (Agua destilada); C+) Control positivo; canaletas 5-9: muestras positivas para *Giardia.*

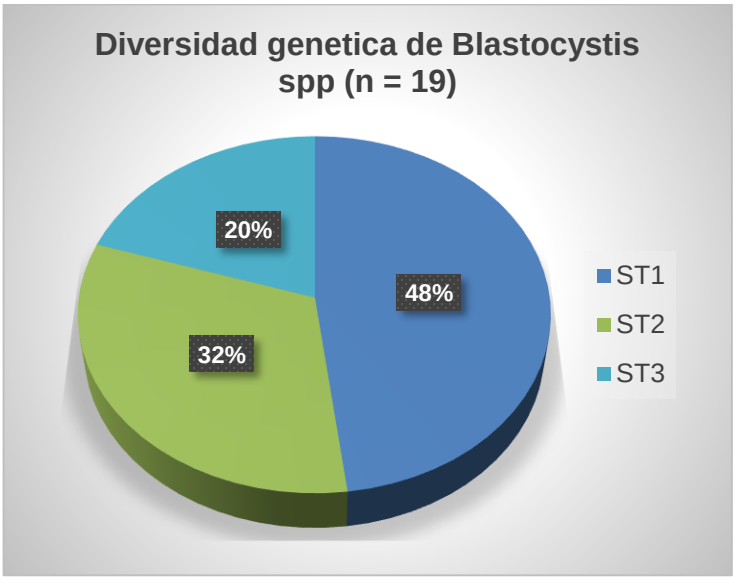


Fuente: El autor.

4.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Blastocystis* spp. Y *Giardia duodenalis*

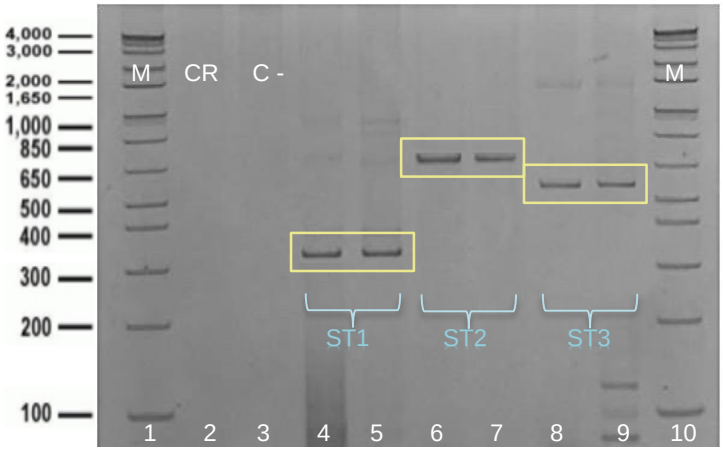
4.3.1. Subtipos de *Blastocystis* spp: Las diecinueve muestras positivas en la detección por PCR general para *Blastocystis* fueron sometidas a las amplificaciones específicas de los siete subtipos (ST 1-7), con mayor prevalencia en humanos en Suramérica y Colombia, teniendo en cuenta lo descrito por Yoshikawa et al (2000). Se encontraron únicamente los tres primeros subtipos: con una distribución de (9/19) para el subtipo 1, (6/19) para el subtipo 2 y (4/19) el subtipo 3 (Figura 18).

Figura 18. Representación gráfica de los valores en porcentaje obtenidos para la diversidad genética de *Blastocystis* spp. (Sobre 19 muestras positivas).



Fuente: El autor.

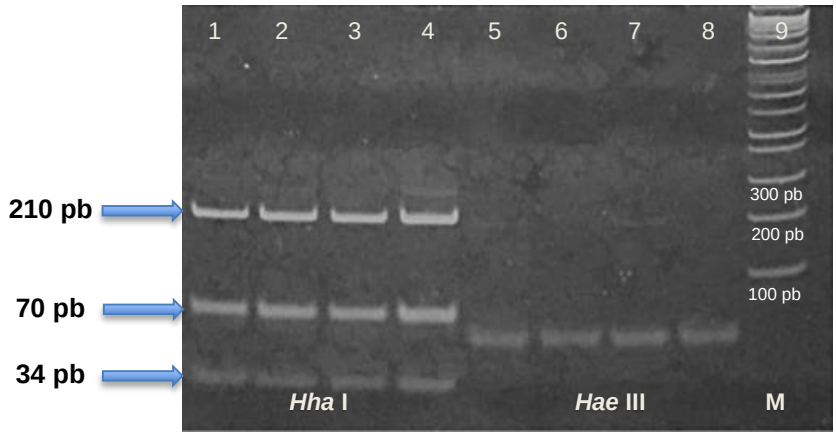
Figura 19. Productos de PCR específicos para subtipos de *Blastocystis* spp. en gel de poliacrilamida al 6%. En los recuadros amarillos, las bandas de 351, 704 y 527 pb para subtipos uno, dos y tres, respectivamente. M) Marcador de peso molecular 1kb plus; CR) Control de reacción; canaletas 4-9: muestras positivas de subtipos de *Blastocystis* spp.



Fuente: El autor.

4.3.2. Genotipos de *Giardia duodenalis*: Los productos de la PCR semianidada para *Giardia duodenalis* fueron sometidos a digestión, para el diagnóstico de genotipos de *Giardia duodenalis*, utilizando las enzimas de restricción: *Hae* III (para el fragmento de 753pb) y *Hha* I (para el fragmento de 384 pb). Todas las 8 muestras positivas presentaron el perfil característico del subgrupo A2/A3, bandas de 210, 70, 34 pb (Figura 12).

Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida, de los productos de digestión del fragmento de 384 pb del gen β-giardina con *Hha* I. Canaletas 1-4: muestras de genotipos A subgrupos A2/A3. Canaletas 5-8: muestras digeridas con la enzima *Hae* III (primera ronda PCR general *Giardia*). M) Marcador de peso molecular 1kb plus.

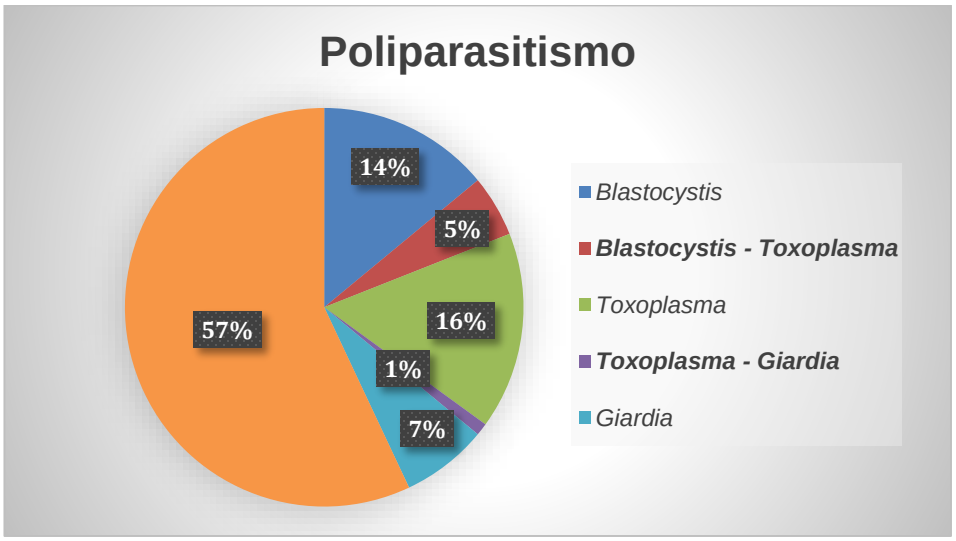


Fuente: El autor.

4.4. POLIPARASITISMO

De las 49 muestras positivas, se encontraron 6 muestras que presentaban infección con más de un parásito; 5 muestras fueron detectadas con coinfección *Blastocystis* - *Toxoplasma* y 1 muestra con *Toxoplasma* – *Giardia.*

Figura 21. Representación gráfica de los valores obtenidos de poliparasitismo en 6 muestras de hortalizas con coinfección.



Fuente: El autor.

5. DISCUSIÓN

5.1. CONCENTRACIÓN DE QUISTES A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL

En este estudio la concentración de quistes utilizando el método de flotación por Sulfato de Zinc (Faust), con la agitación y lavado previo (como se describe en la metodología), arrojó buenos resultados ya que permitió obtener muestras con quistes viables y con menos impurezas y restos, se mostró simple y de fácil ejecución además de bajo costo en comparación con otras técnicas de concentración ensayadas. La técnica de formalina-éter fue utilizada pero las muestras obtenidas al final del procedimiento presentaron una gran cantidad de suciedad y pocos quistes. Así mismo, la técnica de gradiente de sucrosa probaba previamente en el laboratorio por Rodríguez (2014), permitió concentrar una muy baja cantidad de quistes por lo que no fue posible la amplificación del ADN.

En la literatura se reitera la necesidad de estandarizar una metodología que permita obtener quistes de material vegetal como frutas y hortalizas, que faciliten los estudios de detección y control en la seguridad alimentaria. Actualmente, la creciente presencia de enfermedades parasitarias transmitidas por alimentos, ha impulsado a estudiar y estandarizar metodologías aplicables y reproducibles por investigadores del área, generando así uniformidad en los estudios. El análisis de muestras más usado, se basa en la técnica de Takayanagui et al. (2000), que consiste en lavados y agitaciones similares al estandarizado en este trabajo, y una segunda parte aplicando el método Sheater (método de centrifugación flotación) de Atias N. (1998). Por el contrario, el método 1623 (EPA, 2005), es usado en países desarrollados, pero su costo es muy elevado para la investigación; los métodos de Carbonato de calcio (Campbell, 1994), Sulfato férrico y Sulfato de aluminio (Karanis, 2002), presentan como desventaja la perdida de viabilidad de los quistes que interfiere directamente con la identificacion parasitaria en las muestras. Con el método de flotación de Faust, se han obtenido mejores resultados como lo empresa Ica (1990) en una comparación realizada en Perú.

5.2. DETECCIÓN MOLECULAR EN HORTALIZAS

Desde el año 1999, los artículos sobre detección parasitaria en hortalizas, se empiezan a encontrar con más frecuencia, estas publicaciones hasta aproximadamente el año 2016 coinciden en que su detección está basada en técnicas de microscopía y el uso generalizado de variedades de lechuga, por su mayor incidencia parasitaria y morfología óptima para la proliferación. En cuanto a sus resultados son muy heterogéneos, las prevalencias oscilan entre el 6,2 % y el 93,8 %; diferencias que podrían estar asociadas al número de muestras utilizadas en cada estudio, tipo de muestras, variedad de hortalizas o frutas, temporadas de muestreo, áreas de muestreo (Tiendas libres, supermercados, plazas, restaurantes, cultivos), experiencia y precisión del observador en la microscopía y diferencias en metodologías de concentración. Gran parte de estos trabajos fueron realizados en localidades de Brasil, encontrando insectos, ácaros, coliformes fecales, larvas de nemátodos, helmintos, protozoarios ciliados, Tenias, *Toxocara* spp, *Ascaris lumbricoides*, *Entamoeba coli*, *Giardia duodenalis*, *Trichostrongylus* spp, *Strongyloides* spp, *Endolimax nana*, *Entamoeba histolytica, Enterobius vermicularis, Hymelolepis nana y diminuta, Salmonella, entre otros.*

Dentro de estos artículos pioneros se destacan los realizados por: Mesquita y colaboradores (1999) de contaminación por enteroparásitos en hortalizas (lechuga y berro) comercializadas en Niteroi y Río de Janeiro – Brasil; Paula et al. (2003) igualmente, estudió la contaminación microbiológica y parasitológica en lechugas de restaurantes de autoservicio en la mismas localidades de Brasil; Kozan (2005) sobre la prevalencia de huevos de helmintos en vegetales crudos utilizados para ensaladas (lechuga, perejil, zanahoria, cebolla verde, tomates, pimientos, repollo rojo) en Turquía; Santana et al. (2006) observó la calidad física y parasitológica de lechugas en diferentes sistemas de cultivo en Salvador - Brasil; Takayanagui et al. (2007) evaluó la contaminación de cultivos de lechuga después de un sistema de monitoreo en Ribeirao Preto, Sao Paulo; Biscaro et al. (2008) realizó un análisis de las condiciones sanitarias de cultivos vegetales regados con aguas receptoras de afluentes urbanos en Lavapez – Brasil; Gomes Neto et al. (2012) al realizar un recuento de bacterias encontró presencia

parasitaria en hortalizas de hoja en diferentes sistemas de cultivo en Brasil; Eraky et al, (2014) observó contaminación con parásitos en los vegetales frescos de mayor consumo en Benha Egipto; en este mismo año Duedu et al, realizó una encuesta comparativa de la prevalencia de parásitos humanos encontrados en vegetales frescos vendidos en supermercados y mercados al aire libre en Accra, Ghana; Poetini (2015) evaluó la prevalencia de parásitos en lechugas comercializadas en Itaqui en Rio grande del sur; Mohamed et al. (2016) encontró una contaminación parasitaria en vegetales frescos en mercados centrales en el estado de Khartoum – Sudan.

Los anteriores estudios sirvieron de punto de partida para conocer que la presencia parasitaria era inminente y estos alimentos podrían ser un vehículo directo de contaminación. Igualmente, al aumentar el interés en la temática, era necesario acudir a metodologías más exactas y confiables que permitieran la búsqueda de variedades de parásitos. Por ello, las técnicas moleculares serían una herramienta clave para continuar estudiando la contaminación en diferentes eslabones de la cadena epidemiológica, tal como lo expresó Lora et al. (2016): la detección de protozoos tanto en agua como alimentos debe ser confirmada con inmunofluorescencia (IF) y PCR para resultados más claros. Igualmente, Lalonde (2016), realizó un trabajo en el cual pretendía optimizar y validar una detección molecular por medio de PCR en tiempo real, con el fin de identificar y aislar quistes de protozoos en vegetales de hoja verde y bayas.

Colli y colaboradores (2015), encontraron un ensamblaje idéntico (BIV) de *Giardia duodenalis*, en humanos, animales y vegetales, en un área urbana del sur de Brasil, lo cual dejó en manifiesto que las técnicas moleculares nos permiten acercarnos a la epidemiología de los parásitos intestinales, obteniendo unos mejores resultados. En este mismo año Giangaspero realizó una detección molecular de *Cyclospora* en agua, suelo, vegetales y humanos (prevalencias del 20,6%) en el sur de Italia que resaltó la necesidad de un monitoreo por parte de las autoridades de salud. Callejón (2015), llevó a cabo una revisión de los brotes transmitidos por alimentos debido a productos frescos en Estados Unidos y la Unión Europea, durante los años 2004 y 2012, explicando las tendencias y causas. Rostami y colaboradores (2016), realizaron una detección de huevos de

helmintos en hortalizas crudas de consumo común en el norte de Irán. Finalmente, Brent (2016), resaltó que las enfermedades parasitarias asociadas con el consumo de productos frescos es un problema emergente en los países desarrollados, esta postura permitió justificar este proyecto, teniendo en cuenta que las prevalencias encontradas en países desarrollados son altas, es de esperarse que en países en desarrollo donde las condiciones y vigilancia de la seguridad alimentaria es deficiente, las prevalencias estén aún más altas.

5.2.1. Detección general: Se trabajaron un total de 100 muestras de material vegetal (Fresas, apio, cebolla larga, cilantro, zanahoria, lechuga crespa y lisa), en las cuales se encontró un porcentaje considerable de contaminación parasitaria; obteniendo de ellas 49 muestras positivas y 51 negativas. Estos resultados se obtuvieron por medio de PCR convencional para cada parásito (*Giardia duodenalis, Blastocystis* spp*, Toxoplasma gondii, Cryptosporidium* spp).

Los valores obtenidos por contaminación parasitaria en este trabajo (49%), no se diferencia ampliamente de algunos valores obtenidos por investigadores brasileros, 33% (Takayanagui, 2001). Valores inferiores de 16,6% y 6,2% también fueron reportados (Mesquita, 1999; Guilherme, 1999). Pero si contrasta con valores obtenidos de parásitos comensales reportados en otros estudios (85%, 98,1%, 71%, 63%), debido a que se enfocó la búsqueda a 4 parásitos patógenos (Mesquita, 1999; Daryani, 2008; Falavigna, 2005). Esta diferencia de valores de contaminación en hortalizas y frutas, podría deberse a diferentes factores como la variación en las técnicas aplicadas para el diagnóstico, la época de colecta o muestreo, la variedad de condiciones sanitarias en sitios de expendio y grado de manipulación de las hortalizas. Se observa igualmente, que la gran mayoría de trabajos que involucran esta temática, utilizan en sus estudios menos especies de hortalizas y se enfoca la atención principalmente en la lechuga (Guimarães, 2003; Tananta, 2002; Traviezo, 2004).

La contaminación parasitaria, aunque en diferentes porcentajes, se encontró en todos los tipos de hortaliza utilizadas en el estudio (Cilantro 10%, lechuga lisa 10%, fresas 10%,

lechuga crespa 6%, apio 6%, cebolla larga 5%, zanahoria 2%). Lo cual nos indica que es necesario abarcar variedad de hortalizas, que pueden ser potenciales vehículos de contaminación, sin sesgar los trabajos al uso y detección únicamente de la lechuga, como se ha observado de manera generalizada en la literatura. Igualmente, es importante reconocer cuales hortalizas y frutas de acuerdo a su morfología facilitan la presencia de quistes y cuáles de ellas pasan por proceso de cocción o son consumidas crudas; así mismo, se deben identificar las de mayor consumo y comercialización. Estas referencias fueron parámetros considerados en este estudio, que permitió llegar a la elección de estas 7 hortalizas.

Existen otros factores relevantes a considerar en estudios posteriores con mayor cobertura de muestras y epidemiológicos; entre ellos, identificar los lugares de proveniencia de las hortalizas (Departamentos, tipos de cultivo, producción, importadas) que permitan conocer si las zonas donde se han cultivado se caracterizan por el amplio uso de aguas contaminadas, si existe crecimiento demográfico, necesidades en la obtención de recursos hídricos, ríos aledaños que son recolectores de aguas de uso público, doméstico e industrial, drenajes naturales de aguas pluviales, medios de evacuación de desechos sólidos urbanos.

Otro factor que influye en la diferenciación de los niveles de contaminación, es la estructura física de las hortalizas, la presencia de múltiples hojas separadas con una amplia área de contacto, favorece la presencia de las estructuras parasitarias, lo contrario en aquellas de cubierta lisa que facilita la limpieza antes de la venta o el consumo. Así mismo, el contacto amplio con la tierra en la mayor parte de las hortalizas, favorece la contaminación con formas parasitarias, que tienen amplia viabilidad en la tierra húmeda como los quistes de protozoarios, huevos y larvas de helmintos (Muñoz, 2008).

Finalmente, otro factor a considerar, es la prevalencia de parásitos en las personas encargadas de la manipulación de alimentos, con esto realizar capacitaciones respecto a seguridad alimentaria y manejo de alimentos de consumo fresco.

5.2.2. *Toxoplasma gondii:* La prevalencia encontrada de este parásito, fue de 22% en las 100 muestras de hortalizas trabajadas, siendo el que mayor contaminación presentó. Estos resultados se obtuvieron por medio de PCR anidada del gen B1; las bandas tenues se reamplificaron para la confirmación de muestras positivas. Para Colombia, se han realizado diversos estudios que evalúan la presencia de *T. gondii* principalmente en carnes, sin embargo, no se habían llevado a cabo trabajos de detección en vegetales frescos. Un estudio de aguas de Armenia por Triviño-Valencia, Lora-Suárez, Zuluaga, & Gomez-Marin en el 2016 con el uso de la misma n-PCR para el análisis de muestras, reporta una prevalencia del 58,6% de *T. gondii*, lo cual es una muestra clara de la presencia de quistes de este parásito en fuentes hídricas de la región.

En la actualidad, encontramos un artículo que reporta la detección de verduras contaminadas con *T. gondii*, titulado “The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables simples” realizado por Lass, Pietkiewicz, Szostakowska, & Myjak en el 2012, este trabajo, llevado a cabo en la zona norte de Polonia, informa que el 9.7% de las muestras evaluadas (216) por qPCR dieron positivas, basada en el gen B1 de *T. gondii*, sin embargo, algunas de sus muestras reflejaron inhibición con esta metodología.

A nivel mundial, se han reportado dos brotes de toxoplasmosis por agua contaminada con quistes como lo reporta Slifko et al. (2000) , el primer brote ocurrió en Panamá en las tropas británicas, y la evidencia epidemiológica indicó que el vehículo más probable para la transmisión fue la ingestión de agua de arroyo consumida durante las maniobras en la jungla, la cual estaba contaminada con ooquistes excretados por felinos de la jungla; el segundo brote ocurrió en British Columbia, Canadá, en 1995, y se identificaron 110 infecciones agudas por *Toxoplasma*. Cincuenta y cinco estaban en individuos no embarazadas y 42 mujeres estaban embarazadas en el momento de la infección. Once bebés se infectaron. La evidencia epidemiológica fue consistente con una fuente de agua e implicó al agua potable municipal. Estos dos hechos demuestran que los ooquistes que contaminan las fuentes hídricas pueden llegar a comunidades y afectarlas severamente. En la actualidad no hay pruebas disponibles que puedan determinar la fuente de

infección, por lo tanto la proporción de la población humana que adquiere la infección por ingesta de ooquistes en el medio ambiente o por el consumo de carne contaminada no se conoce (Dubey et al., 2011).

Los ooquistes eliminados en las heces de los felinos contaminan el medio ambiente y estos tienen una gran probabilidad de ser ingeridos junto con el agua o los alimentos crudos como los vegetales frescos que son regados por aguas contaminadas, lo que representa una fuente de infección para los animales de sangre caliente y el humano (Jones & Dubey, 2012; Silva, Andrade, Carneiro, & Vitor, 2014; Slifko, Smith, & Rose, 2000; Weiss & Dubey, 2009).

5.2.3. *Blastocystis* spp: En las muestras de hortalizas se encontró una prevalencia del 19 % por medio de PCR general y se realizó la caracterización con PCR específica para subtipos, con una distribución de (9/19) para el subtipo 1, (6/19) para el subtipo 2 y (4/19) el subtipo 3 (Figura 17).

La presencia de este parásito por lo general, se evidencia en exámenes coprológicos, los reportes en hortalizas son pocos y a nivel regional sería el primero. Es un protozoario muy controvertido debido a que se desconoce su capacidad infectiva e incluso se le atribuye como un parásito comensal que no produce efecto negativo en el hospedero; excepto en pacientes inmunocomprometidos (Muñoz, 2005).

Dentro de los pocos trabajos que se conocen, donde se reporta la presencia de este parásito en material vegetal, están los siguientes: En La Paz, Bolivia se realizó el primer reporte para el país de *Blastocystis* en hortalizas con una prevalencia del 21,6%, trabajo realizado en mercados públicos, utilizando 14 tipos de hortalizas (Muñoz, 2008). Soares et al, (2007), detectaron un 20,8% de prevalencia en lechugas y 24,8% en berro. En Trujillo - Perú, se realizó un trabajo parasitológico con muestras de alimentos cocidos y crudos de mercados y colegios, el análisis de estos permitió aislar protozoos como *Blastocystis* (detectado también en bivalvos moluscos del genero Donax), *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis*, *Endolimax nana, Iodamoeba butschlii* (Pérez et al.,

2008). Finalmente, un valor inferior (1%), a partir de muestras de lechuga en Lara Venezuela, fue señalado por Traviezo et al, (2005).

La ruptura de la vacuola de *Blastocystis* por el contacto con el agua utilizada en los métodos de concentración, podría ser un factor que explicaría el valor bajo en algunos estudios, si se compara con los porcentajes (80,2%) encontrados en manipuladores de alimentos (Amato, 2004). Igualmente, la mayoría de estudios no refieren la presencia de *Blastocystis,* probablemente por el desconocimiento de las diferentes formas evolutivas y por qué no se le otorga la importancia sanitaria debida (Muñoz, 2008).

A nivel nacional, la investigación de *Blastocystis spp* está en pleno desarrollo, los trabajos a partir de metodologías moleculares están enfocados en la prevalencia y diversidad genética en humanos, encontrando resultados entre 45% y un 88,7% (Ramírez et al., 2014; Ramírez et al., 2017; Sánchez et al., 2017). Estos porcentajes fueron una justificación para la búsqueda del parásito en hortalizas de consumo fresco a nivel regional.

En cuanto a su diversidad genética, los estudios internacionales reportan al subtipo 3 (ST3) como el de mayor prevalencia, seguido de los subtipos 1 y 2, la presencia del 4 al 7 es más escasa y se encuentra principalmente en Asia y África (Stensvold et al., 2011). A nivel nacional, se conocen tres trabajos de diversidad genética del parásito; el primero a partir de muestras fecales humanas y animales, mostró una mayor prevalencia del ST1 (34%), seguido del ST2 (23%), en menor proporción los subtipos 3, 4, 6 y 8 (Ramírez et al., 2014). Los dos estudios más recientes, por el contrario, reportan mayor prevalencia del ST3, seguido de ST2 y ST1, reportando igualmente los subtipos 4, 6 y 7; uno fue realizado con la población infantil en una comunidad indígena del rio amazonas (Sánchez et al., 2017), y el segundo también con población infantil en diferentes regiones geográficas del país (Ramírez et al., 2016).

Los resultados obtenidos en el presente estudio a partir de material vegetal son los primeros a nivel regional, sin embargo, coinciden con la diversidad genética de

Blastocystis en humanos, que se ha reportado en estudios anteriores realizados en Suramérica (trabajo que incluyó a Colombia) (Ramírez et al., 2016), a nivel nacional (Ramírez et al., 2014), y a nivel departamental con los resultados para el municipio del Guamo (Ramírez et al., 2017); en todos ellos identificaron los STs 1, 2 y 3, siendo el de mayor ocurrencia el subtipo 1.

5.2.4. *Giardia duodenalis:* Para la detección de este parásito en las 100 muestras, se llevó a cabo la amplificación del gen β-giardina mediante una PCR semianidada. Obteniendo una prevalencia del 8% en las muestras vegetales analizadas. Posteriormente, las 8 muestras positivas de la PCR general se sometieron a un corte con las enzimas de restricción: *Hae* III y *Hha* I, las cuales presentaron el perfil característico del subgrupo A2/A3.

A nivel internacional, según la última revisión realizada por Ryan (2019), se reconoce que la trasmisión de patógenos zoonóticos a través de alimentos son un problema grave para la salud pública, incluso un resultado importante para la economía mundial. Sin embargo, se han documentado muy pocos brotes por las limitaciones en la detección actual de *Giardia duodenalis* y la falta de vigilancia en alimentos.

El método actual de recuperación de quistes de *Giardia* en matrices como alimentos usando inmunomagnetismo, requiere de una mejor estandarización y reducción de costos antes que pueda emplearse ampliamente; también, debe incorporar procedimientos moleculares posteriores para el genotipado, análisis y viabilidad. Concluyen igualmente, que la giardiasis trasmitida por alimentos puede ser controlada a través de mejoras en el sistema de vigilancia a nivel nacional o regional, con análisis de riesgos, intervenciones en puntos críticos de control, prevalencia real del parásito y su impacto en la salud pública (Ryan, 2019). Las prevalencias siguen siendo variables, debido a la distribución geográfica de subtipos, diferentes metodologías aplicadas, tipos y cantidad de muestras utilizadas en cada estudio; sin embargo, los reportes realizados oscilan en porcentajes desde el 0,6% hasta un 12,5% de prevalencia, tales como: En la paz Bolivia (0,6%), en área metropolitana Sao Paulo - Brasil (2,3%), municipio de

Ribeirao Preto SP (11,2%), ciudad de Florianopolis - Brasil (12,5%); en Trujillo Perú, con muestras de alimentos cocidos y crudos de mercados y colegios (5,3%) y en manipuladores de alimentos (4,7%) (Muñoz, 2008; Oliveira, 1992b; Takayanagui, 2001; Pérez et al., 2008).

Ryan (2019), realiza una revisión con los últimos reportes y prevalencias de *Giardia duodenalis* en material vegetal fresco, encontrando la siguiente información: Brasil: lechuga, col rizada, achicoria y cohete de mercados callejeros y huertos comunitarios (7.3% 19/260), ensamblajes AI, B, E (Rafael et al., 2018). Chandigarh, norte de India: mercados públicos y supermercados (5% 13/284) genotipos A y D (Utaaker et al., 2017). Italia: ensaladas listas para comer de supermercados (0.6% 4/72), genotipo A (Caradonna et al., 2017). Brasil: verduras de hoja en mercados públicos (12.5% (16/128) por PCR; 0.8% (1/128) por microscopía), ensamblaje AII (Tiyo et al., 2016). Sudán, estado de Jartum: vegetales de mercados públicos (3% 8/260) (Mohamed et al., 2016). Sur de Brasil: lechuga y achicoria silvestre de productores locales (18.2% 2/11) ensamblaje BIV (Colli et al., 2015). Suroeste de Etiopía: frutas y vegetales de mercados públicos (7.5% 27/360) (Tefera et al., 2014). Egipto, Benha: vegetales de hoja en mercados públicos (8.8% 47/530) (Eraky et al., 2014). Valencia España: recolección en campo de áreas agrícolas (52.6% 10/19) (Amorós et al., 2010). Finalmente, prevalencias muy similares son reportadas en países como: Noruega, Reino Unido, Italia (Palermo), Turquía (Kahramanmaras), Marruecos (Marrakech), Costa Rica y Filipinas.

A nivel regional, se realizó un trabajo por Rodríguez (2014), de genotipificación de quistes de *Giardia duodenalis* aislados en niños y animales domésticos en la ciudad de Ibagué, encontrando una prevalencia del 11,78% (genotipos A2/A3 y B) en niños asistentes a los hogares adscritos al ICBF y 7,36% de giardiosis en la totalidad de los animales muestreados

6. CONCLUSIONES

Se detectaron muestras positivas para tres parásitos, observándose la prevalencia más alta para *Toxoplasma gondii* (22%), seguido de *Blastocystis* spp (19%), *Giardia duodenalis* (8%) y finalmente *Cryptosporidium* spp (0%).

Se estandarizó una metodología para concentración de quistes a partir de muestras vegetales, obteniendo ADN viable que garantizó la amplificación de la PCR en cada parásito.

Los métodos moleculares aportaron una alta sensibilidad que permitió encontrar *Giardia duodenalis*, *Toxoplasma gondii y Blastocystis* spp, en muestras de hortalizas, observándose una mayor prevalencia en muestras provenientes de las plazas de mercado de la cuidad.

En la caracterización de *Blastocystis,* se encontraron 3 subtipos en las 19 muestras positivas con prevalencias para ST1 de 48% (9/19), ST2 32% (6/19), ST3 20% (4/19). Las muestras con *Giardia duodenalis* se sometieron a una PCR - RFLP para conocer a que genotipo pertenecían, encontrando que las 8 muestras positivas correspondían al genotipo A y subgrupo AII.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios epidemiológicos, cuyos objetos de estudio involucre a pacientes, otros parásitos de interés, información clínica, seguimiento a la producción, distribución y manipulación de hortalizas y frutas, en tiendas y plazas de la ciudad, que aporten información valiosa para entender y prevenir la contaminación por parásitos intestinales.

Se considera pertinente el monitoreo periódico de los establecimientos públicos que expenden alimentos al aire libre (plazas de mercado), por parte de las entidades competentes; así como la implementación de buenas prácticas de manejo de las hortalizas desde su cultivo hasta la preparación en manos del consumidor final.

Generar información destinada a las comunidades, al Ministerio de Salud y la protección Social, a los productores y distribuidores para que adopten medidas para el control de calidad de la cadena productiva de frutas y hortalizas para consumo interno o para exportación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha P, Szyfres B. (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. *3° ed. Washington: OPS* . 413 p.

Agudelo GM, Cardona OL, Posada M, Montoya MN, Ocampo NE, Marín CM, et al. (1999). Prevalencia de anemia ferropénica en escolares y adolescentes, Medellín, Colombia. *Rev Panam Salud Pública* 13(6). http:// www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102049892003000500006&lng=es&nrm=iso&tlng=es.

Agudelo-López S, Gómez-Rodríguez L, Coronado X, Orozco A, Valencia-Gutierrez CA, Restrepo-Betancur LF, et al. (2008). Prevalencia de Parasitosis Intestinales y Factores Asociados en un Corregimiento de la Costa Atlántica Colombiana. *Rev Salud Pública.* 10(4):633-42.

Alcaraz Soriano M. (2001). Giardia y Giardiosis. Servicio de microbiología hospital universitario Doctor Peset Aleixandre. Valencia. *Control Calidad SEIMC* Pdf: 1-9.

Alexeieff A. (1911). Sur la nature des formations dites kystes de Trichomonas intestinalis. *C R Soc. Biol.* 71:296–298.

Alger J. (1997). *Blastocystis hominis*: Patógeno o Comensal?: Revisión de la evidencia. *Rev Med Hondur*. 65: 114-117.

Amato Neto V, Alarcón RSR, Gayika E, Becerra CR, Ferreira SC, Braz AML. (2004). Blastocistose: controversias e indefinições. *Rev Soc Bras Med Trop*. 37: 354-356.

Arboleda M, Lopera T, Restrepo M, Botero D, Lotero MC, Rios P. (2004). Efectos de la desparasitación comunitaria en la población infantil del área urbana de Apartadó, Colombia. *Rev CES Med*. 18(1):51-9. 59.

Atias N. (1998). Parasitología. 3ra ed. Chile: OPS.

Awatif MA, Init I, Hesham MA, Khan AH, Abdulsalam A, Surin J, et al. (2013). Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis spp.* in Sebha, Libya. *Parasit Vectors*. 6: 86.

Bahia-Olivera, L., Gomez-Marín, J. E., & Shapiro, K. (2017). Global Water Pathogen Project. En R. Fayer & W. Jakubowski (Eds.), *Global Water Pathogen Project*.

Michigan State University, E. Lasing, MI.: UNESCO.

Barriga O. (1997). Inmunología de las infecciones parasitarias. En: *Atías A (ed). Parasitología Médica.* Chile: Ed. Mediterráneo. p 67-101.

Basualdo J, Pezzani B, De Luca M, Córdoba A, Apezteguía M. (2000). Screening of the municipal water system of La Plata, Argentina, for human intestinal parasites. *Int J Hyg Environ Health*; 203: 177-82.

Bensen, W. (1909). Trichomonas intestinalis und vaginalis des; *Menschen Arch Protistenkd;* 18:115–127.

Biagi F. Enfermedades Parasitarias. Ediciones Cientificas *La Prensa Médica Mexicana,* 2ª ed. México D.F., 1988.

Biscaro G.A., Guimarães-Tomazela O.B., Leite Cruz, Domingos Lopes. (2008). Aspectos sanitários do cultivo da alface americana, irrigada com águas recptoras de efluentes urbanos. *Ciênc. agrotec., Lavras,* v. 32, n. 1, p. 295-301.

Bohne A, Prowazek S. (1908). Zur Frage der Flagellatendysenterie; *Arch Protistenkd*; 12:1–8.

Boreham P, Stenzel D. (1993). *Blastocystis* in humans and animals: *morphology, biology, and epizootiology Adv Parasitol*; 32:1–70.

Boreham PFL, Stenzel DJ. (1993). *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. Adv Parasitol; 32:1–70.

Brent R. Dixon. (2016). Parasitic illnesses associated with the consumption of fresh produce an emerging issue in developed countries. *Current opinion in food science.* Vol 8. 104 – 109.

Brumpt E. (1912). Colite a Tetramitus mesnili et colite a *Trichomonas intestinalis* Leuchart 1879. *Blastocystis hominis* n sp et formes voisines. *Bull Socww Pathol Exot*; 5:725–730.

Burg, J. L., Grover, C. M., Pouletty, P., & Boothroyd, J. C. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, *27*(8), 1787-1792.

CAC. (2003). Código de prácticas de higiene para las frutas y hortalizas frescas. Las técnicas para la manipulación y almacenamiento higiénicos.

http://www.ebookio.com/.../c%26Atilde%3Boigo-de -pr%26Atilde%3B…ticas-de-higiene-para-las-frutas-y-hortalizas-frescas.

Caccio S, Thompson A, McLauchlin J, Smith HV. (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol*; 21: 430-7.

Caccio SM, Pozio E. (2006). Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 4: 429-43.

Caccio, S.M. & Sprong, H. (2010). *Giardia duodenalis*: Genetic recombination and its impliions for taxonomy and molecular epidemiology. *Experimental Parásitology, 124,* 107–112.

Caccio, S.M., De Giacomo, M. & Pozio, E. (2002). Polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parásitology, 32,* 1023–1030.

Callejón RM, Rodríguez-Naranjo MI, Ubeda C, Hornedo-Ortega R, Garcia-Parrilla MC, Troncoso AM. (2015). Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. *Foodborne Pathog Dis*. 12(1):32-8. doi: 10.1089/fpd.2014.1821.

Capuano DM, Okino MHT, Bettini MJCB. (2002). Busca ativa de teníase e de outras enteropa-rasitoses em manipuladores de alimentos no município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 61:33-8.

Cardona Arias JA, Bedoya Urrego K. (2013). Frecuencia de parásitos intestinales y evaluación de métodos para su diagnóstico en una comunidad marginal de Medellín, Colombia. *Latreia.* 26(3):257-68.

Castro BML, Rojas WG, Haro AI, Salazar SPM. (1995). Búsqueda de quistes y huevos de parásitos intestinales humanos en vegetales y frutas. *Rev Mex Patol Clin*. 42: 129-135.

Castro de Navarro L, Nicholls RS. (1998). Deficiencia de hierro, vitamina A y prevalencia de poliparasitismo intestinal en la población infantil y anemia nutricional en mujeres en edad fértil, Colombia, Santafé de Bogotá. *División de Biblioteca y Publicaciones, INS.* 1995-96. 1ª ed.

Castro-Hermida JA, González-Losada YA, Mezo-Menéndez M, Ares-Mazas E. (2002). A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves.*Vet Parasitol*; 106: 11-7.

Cavalier-Smith T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc*; 73(3):203-66.

Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society, 73* (3), 203- 266.

CDC.(2019).Giardiasis.http://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/DPDx/HTML/Frames/G-L/Giardiasis/body_Giardiasis_page1.

Chandramathi S, Suresh K, Kuppusamy U, Anita ZB. (2012). Infections of *Blastocystis hominis* and microsporidia in cancer patients: are they opportunistic? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 106: 267-269.

Chappell CL, Okhuysen PC, Sterling CR, Dupont HL. (1996). *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. *J Infect Dis;* 173: 232-6.

Chen XM, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF. (2002). Cryptosporidiosis. *N Engl J Med*; 346: 1723-31.

Coaguila JF. (1993). Evaluación de la contaminación y producción de hortalizas irrigadas con aguas residuales en el Valle de Río Abajo La Paz. *[Tesis de Licenciatura]. Cbba-Bolivia: Universidad Mayor de San Simón.*

Coelho LMPS, Oliveira SM, Milman MHSA, Karasawa KA, Santos RP. (2001). Detecção de formas transmissíveis de enteroparasitas na água e nas hortalições consumidas em comunidades escolares de Sorocaba, São Paulo, Brasil. *Rev Sock Bras Med Trop.* 34: 479-482.

Colli CM, Bezagio RC, Nishi L, Bignotto TS, Ferreira ÉC, Falavigna-Guilherme AL, et al. (2015). Identical Assemblage of Giardia duodenalis in Humans, Animals and Vegetables in an Urban Area in Southern Brazil Indicates a Relationship among Them. *PLoS ONE* 10(3): e0118065. doi:10.1371/journal.pone.0118065.

Corredor A, Arciniegas E, Hernández CA. (2000). Parasitismo intestinal. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia: *Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud*.

Coyle C, Varughese J, Weiss L, Tanowitz H. (2012). *Blastocystis*: to treat or not to treat. *Clin Pract.* 54: 105-110.

Darde ML, Ajzenberg D, Smith J. (2007). Population structure and epidemiology of Toxoplasma gondii. In: Weiss LM, Kim K (eds). *Toxoplasma gondii*. The model

apicomplexan: perspectives and methods. *United Kingdom: Academic Press*. p 49-80.

Daryani A, Ettehad GH, Sharif M, Ghorbani L, Ziaei H. (2008). Prevalence of intestinal parasites in vegetables consumed in Ardabil, Iran. *Food Control.* 19: 790–794.

Daryani A, Ettehad GH, Sharif M, Ghorbani L, Ziaei H. (2008). Prevalence of intestinal parasites in vegetables consumed in Ardabil, Iran. *Food Control*. 19: 790–794.

Del Coco VF, Basualdo JA. (2008). *Cryptosporidium*: un parásito emergente. En: *Abuin JC et al., editores.* Temas de Zoonosis IV. Buenos Aires, Asociación Argentina de Zoonosis, p. 325-32.

Dixon BR. (2016). Parasitic illnesses associated with the comsumption of fresh produce – an emerging issue in developed coutires. *Current Opinion in Food Science*. 8:104-109.

Domínguez, MV. (2003). Heterogeneidad genética de *Blastocystis hominis*: implicaciones patogénicas [Tesis de grado]. *Departamento de Microbiología y Ecología: Universitat de Valencia*.

Dorny P, Speybroeck N, Verstraete S, Baeke M, De Becker A, Berkvens D, Vercruysse J. (2002). Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. *Vet Rec* 151: 626-629.

Dubey JP, Lappin MR. (1998). Toxoplasmosis and neosporosis. In: *Greene CE (ed). Infectious diseases of dog and cat. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders.* p 493-509.

Dubey JP, Lappin MR. (2000). Toxoplasmosis y neosporosis. En: Greene CE (ed). Enfermedades infecciosas en perros y gatos. *2° ed. México: McGraw Hill Interamericana.* p 493-503.

Dubey, JP. (2009). History of the discovery of the life cycle of Toxoplasma gondii. *International Journal for Parasitology*, *39*(8), 877–882. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.005.

Dubey JP. (2010). *Toxoplasma gondii* infections in chickens (Gallus domesticus): Prevalence, clinical disease, diagnosis, and public health significance. *Zoonoses Public Health* 57: 60-73.

Dubey, JP., Rajendran, C., Ferreira, L. R., Martins, J., Kwok, O. C. H., Hill, D. E., … Jones, J. L. (2011). High prevalence and genotypes of Toxoplasma gondii isolated

from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *International Journal for Parasitology*, *41*(8), 827–833. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.006.

Duedu KO, Yarnie EA, Tetteh-Quarcoo PB, Attah SK, Donkor ES and Ayeh-Kumi. (2014). A comparative survey of the prevalence of human parasites found in fresh vegetables sold in supermarkets and open-aired markets in Accra, Ghana. *BMC Research Notes*, 7:836.

Dunand VA, Hammer SM, Rossi R, Poulin M, Albrecht MA, Doweiko JP, et al. (1997). Parasitic sinusitis and otitis in patients infected with human immunodeficiency virus: report of five cases and review. *Clin Infect Dis*; 25: 267-72.

Dunn LA, Boreham PFL, Stenzel DJ. (1989). Ultrastructural variation of Blastocystis hominis stocks in culture. *Int J Parasitol*; 19:43–56.

Dunn LA, Boreham PFL. (1991). The in-vitro activity of drugs against *Blastocystis hominis*. *J Antimicrob Chemother*; 27:507–516.

Dzib-Paredes GF, Rosado-Aguilar JA, Acosta-Viana KY, Ortega-Pacheco A, Hernández-Cortázar IB, Guzman-Marín E, Jiménez-Coello M. (2016). Seroprevalence and parasite load of Toxoplasma gondii in Mexican hairless pig (Sus scrofa) tissues from the Southeast of Mexico. *Vet Parasitol.* 229:45-49. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.09.016.

Entrena AAG. (2011). Desarrollo de un sistema inmunoenzimático de inhibición de un anticuerpo, para el diagnóstico de *Toxoplasma gondii* en diferentes especies. *Tesis Doctoral. San José de las Lajas, Cuba: Universidad Agraria de La Habana.* 126 p.

Eraky MA, Rashed SM, El-Sayed Nasr, Salah M, El-Hamshary, and El-Ghannam A. (2014). Parasitic Contamination of Commonly Consumed Fresh Leafy Vegetables in Benha, Egypt. *Journal of Parasitology Research*, Volume 2014, Article ID 613960, 7 pages. http://dx.doi.org/10.1155/2014/613960.

Erdogrul Ö, Şener H. (2005). The contamination of various fruit and vegetable with Enterobius vermicularis, Ascaris eggs, Entamoeba histolyca cysts and Giardia cysts. *Food Control.* 16: 559-562.

Espinosa Morales M, Alazales Javiqué M, García Socarrás M. (2011). Parasitosis intestinal, su relación con factores ambientales en niños del sector «Altos de Milagro», Maracaibo. *Rev Cuba Med Gen Integr*. 27(3):396-405.

Falavigna LM, De Freitas CBR, De Melo GC, Nishi L, de Araújo SM, Guilherme- Falavigna AL. (2005). Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. *Parasitol Latinoam*. 60:144-9.

Falavigna LM, Freitas CBR, Melo GC, Nishi L, Araújo SM, Guilherme ALF. (2005). Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. *Parasitol Latinoam.* 60:144 - 149.

FAO. (2003) Departamento de Agricultura y Protección al consumidor. Capítulo 4: Aspectos higiénicos y sanitarios. En: López Camelo AF. Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas: Del campo al mercado. http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4893S/y4893s07.htm#bm07.

FAO. (2006). Calidad de Alimentos y Estándares de la División de Alimentos y Nutrición. Información adicional sobre el trabajo de esta División en lo que concierne a calidad de alimentos y materias relacionadas a seguridad, incluyendo la producción de frutas frescas y vegetales. http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/ESN/nutri.htm.

Faria JAS, Silva AA, Faria MSC. (1987). Estudo da poluição das águas de irrigação de hortas por cistos e ovos de enteroparasitas. *Rev Bai Saúde Pública*. 14:141-4.

Faust EC, D'Antoni JS, Odon V, Miller MJ, Peres C, Sawitz W, *et al*. (1938). A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. *Preliminary communication*. *Am J Trop Med Hyg*. 18:169-83.

Fayer R. (2004). *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol*; 126: 37-56.

Fayer R. (2008). General biology. En: *Fayer R, Xiao L, editores*. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. New York, CRC Press, p. 1-42.

Fayer, R. (2009). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium. Exp Parasitol* 2009, doi: 10.1016/j.exppara. 03.005.

Fernández-Niño JA, Reyes-Harker P, Moncada-Álvarez LI, López MC, Cháves MP, Knudson A, Ariza Y. (2007). Soil-transmitted helminth trends and prevalence in La Virgen, Colombia 1995-2005. *Rev Salud Pub*; 9:289-96).

García A, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Orden JA, Cid D, Sanz R, Gómez-Bautista M, de la Fuente R. (2000). Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*; 23: 175-83.

Gassman L.; Schwartzbrod J. (1991). Wastewater and Giardia cysts. *Water Science Technology*. 24: 183-186.

Gomes Neto NJ, Lucena Pessoa RM, Barbosa IM, Queiroga N, et al. (2012). Bacterial counts and the occurrence of parasites in lettuce (*Lactuca sativa*) from different cropping systems in Brazil. *Food Control* (28) 47- 51.

Gómez F. (2004). Estudio sobre la toxoplasmosis en Andorra y el Alto Urgel. *Tesis Doctoral. Barcelona: Universidad de Barcelona.* 289 p.

Guilherme ALF, Araújo SM, Falavigna DLM, Pupulim ART, Dias ALGG, Oliveira HS, Maroco E. Fukushigue Y. (1999). Prevalência de enteroparasitas em horticultores e hortaliças da Feira do Produtor de Maringá, Paraná. *Rev Soc Bras Med Trop.* 32:405-411.

Guimaraes AM, Alves EGL, Figueiredo HCP, Costa1 GMC, Rodrigues LS. (2003). Freqüência de enteroparasitas em amostras de alface (Lactuca sativa) comercializadas em Lavras, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36: 621-623.

Guimarães AM, Alves EGL, Figueiredo HCP, Costa1 GMC, Rodrigues LS. (2003). Freqü.ncia de enteroparasitas em amostras de alface (Lactuca sativa) comercializadas em Lavras, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36: 621-623.

Haughwout FG (1918). The tissue-invasive powers of the fl agellated and ciliated protozoa with especial reference to Trichomonas intesitialis; *A critical review Philipp J Sci*; 8:217–258.

Hernández Cruza PE. (2010). Bacterias patógenas emergentes transmisibles por los alimentos. *Universidad Complutense de Madrid*. http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1111/1128.

Ho LC, Armiugam A, Jeyaseelan K, Yap EH, Singh M. (2000). Blastocystis elongation factor1alpha: genomic organization, taxonomy and phylogenetic relationships. *Parasitology*.121 (Pt 2):135-44.

Hunter PR, Nichols G. (2002). Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium*

infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*; 15: 145-54.

Iguchi A, Ebisu A, Nagata S, Saitou Y, Yoshikawa H, Iwatani S, et al. (2003). In vitro response of *Blastocystis hominis*against traditional Chinese medicine. *J Ethnopharmacol.* 126: 119-123.

INST (Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo). (2015). Fichas de agentes biológicos, *Giardia lamblia*. *NotaBio*. DB-P-G.1-15.

James WM. (1914). A study of the Entamoebae of man in the Panama Canal zone Ann; *Trop Med Parasitol*; 8:133–320.

Jones JL, Dubey JP. (2010). Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. *Exp Parasitol* 124: 10-25.

Jones, J. L., & Dubey, J. P. (2012). Foodborne Toxoplasmosis. *Journal of Food Safety*, *55*(1), 845–851. https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1991.tb00063.x.

Jones, C. D., Okhravi, N., Adamson, P., & Tasker, S. (2000). Comparison of PCR Detection Methods for *B1*, P30 and 18S rDNA Genes of *T . Gondii* in Aqueous Humor. *Investigative Ophthalmology*, *41*(3), 634-644. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00170-8.

Käferstein F, Abdussalam M. (1999). Food safety in the 21st century. *Bull WHO*. 77:347-351.

Khan A, Taylor S, Su C, Sibley LD, Paulsen I, Ajioka JW. (2007). Genetics and genome organization of *Toxoplasma gondii*. In: Ajioka JW, Soldati D (eds). Toxoplasma molecular and cellular biology. *United Kingdom: Horizon Bioscience.* p 193-207.

Kobayashi A, Hara T, Kajima J. (2006). Historical aspects for the control of soil-transmitted helminthiases. *Parasitol Int. Supplement.* 55, S289-S291.

Korman SH, Deckelbaum JR. (1993). Enteric Parasites. *En: Wyllie R, Hyams J. Pediatric gastrointestinal disease. W.B. Saunders.* Philadelphia, págs. 652-669.

Kozan Esma a, Bahadir Gonenc b, Oguz Sarimehmetoglu b, Hasan Aycicek. (2005). Prevalence of helminth eggs on raw vegetables used for salads. *Food Control* 16 239–242.

Kucik C.; Martin G.; Sortor B. (2004). Common Intestinal Parasites. *American Family Physician.* 5: 1161-1169.

Lalonde Laura F, Alvin A Gajadhar. (2016). Optimization and validation of methods for

isolation and real-time PCR identification of protozoan oocysts on leafy green vegetables and berry fruits. Food and waterborne parasitology. Vol 2, 1-7.

Lass, a., Pietkiewicz, H., Szostakowska, B., & Myjak, P. (2012). The first detection of Toxoplasma gondii DNA in environmental fruits and vegetables samples. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *31*(6), 1101–1108. https://doi.org/10.1007/s10096-011-1414-8.

Lindsay DS, Blagburn BL, Dubey JP. (1997). Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst. *Parasitol* 19: 448-461.

Mandell GD, Bennett JE, Dolin R. (2009). Principles and practices of infectious diseases. Seventh. Philadelphia*: Churchill Livingstone*; 4320 p.

Marquardt W., Demaree R. Jr. (1985). Parasitology. *Macmillan Publishing Company,* New York USA.

Marrugan JM, Torres MC. (1993). Infestación por *Blastocystis hominis*. *Bol Pediatr*. 34: 127- 135.

Matthews KR. (2008). Los microorganismos asociados a las frutas y a las verduras. En: Microbiología de frutas y verduras. Zaragoza. *Ed. Acribia*, S.A

Méndez OC, Szmulewicz G, Menghi C, Torres S, González G, Gatta C. (1994). Comparison of intestinal parasite infestation indexes among HIV positive and negative populations. *Medicina (Buenos Aires);* 54: 307-10.

Mercier C, Cesbron-Delauw MF. (2015). Review. *Toxoplasma* secretory granules: one population or more? *Trends in Parasitology.* 31(2):60–71.

Mesquita CLV, Serra MBC, Bastos MPO, Uchôa MAC. (1999). Contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 32: 363-366.

Mesquita CLV, Serra MBC, Bastos MPO, Uchôa MAC. (1999). Contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 32: 363-366.

Mesquita Vanessa C.L, Cathia M.B. Serra, Otílio M.P. Bastos e Cláudia M.A. Uchôa. (1999). Contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 32(4):363-366.

Mohamed MA, Siddig E, Elaagip AH, Edris AM, Awad Nasr (2016). Parasitic contamination of fresh vegetables sold at central markets in Khartoum state, Sudan. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 15:17. DOI 10.1186/s12941-016-0133-5.

Morpeth SC, Thielman NM. (2006). Diarrhea in patients with AIDS. *Curr Treat Options Gastroenterol*; 9: 23-37.

Muñoz V, Frade C. Blastocystis hominis: Parásito enigmático. Cuadernos. 2005; 50: 133-145.

Muñoz, O., & Nancy, L (2008). Alta contaminación por enteroparásitos de hortalizas comercializadas en los mercados de la ciudad de La Paz, Bolivia. *Biofarbo, vol 16.*

Narkewicz MR, Janoff EN, Sokol RJ, Levin MJ. (1989). Blastocystis hominis gastroenteritis in a hemophiliac with acquired immune defi ciency syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 8:125–128.

Noel C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, HO LC, et al. (2005). Molecular phylogenies of Blastocystis isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identifi cation of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol*; 43:348-355.

Oliveira CA, Germano PM. (1992a). Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil. I - Pesquisa de helmintos. *Rev Saúde Pública*. 26: 283-289.

Oliveira CA, Germano PM. (1992b). Presence of intestinal parasites in vegetables sold in the metropolitan area of Sao Paulo, SP, Brazil. II - *Research on intestinal protozoans. Rev Saúde Pública*. 26: 332-335.

OMS (Organización Mundial de la Salud) Helmintiasis transmitidas por el suelo. (2015): http:// www.who.int/mediacentre/factsheets/ fs366/es/.

OMS. (1986). Comité de Expertos en Prevención y Control de Infecciones Parasitarias Intestinales. (*Serie de Informes Técnicos Ginebra*. 749).

Pappas G, Roussos N, Falagas ME. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol* 39: 1385-1394.

Parija SC, Jeremiah SS. (2013). *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. *Trop Parasitol*.; 3(1): 17-25.

Paula Patrícia, dos Santos Rodrigues P.S., Oliveira Tórtora J.C., Antunes Uchôa C.M., e Sheila Farage. (2003). Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (Lactuca sativa) de restaurantes self-service, de Niterói, RJ. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(4): 535-537.

Pena HFJ, Soares RM, Amaku M, Dubey JP, Gennari SM. (2006). *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Res Vet Sci* 81: 58-67.

Perales, MR. (2010). *Blastocystis hominis* y *Enterocytozoon bieneusi*: enteropatógenos emergentes con potencial zoonótico. *Sirivs*. p.17

Pérez G, Rosales MJ, Renzo A, Vargas-Vásquez F, Cordova O. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* (2008). Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de trujillo, perú. 25(1):144.

Petersen E, Dubey JP. (2001). Biology of toxoplasmosis. In: Joynson DHM, Wreghitt TG (eds). Toxoplasmosis: A comprehensive clinical guide. United Kingdom: *Cambrigde University Press.* p 1-42.

Piekarsky G. (1989). Medical Parasitology. *Ed. Springer-Verlag*, New York USA.

Pittman KJ, Knoll LJ. (2015). Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of Toxoplasma gondii during Acute and Chronic Infections. *Microbiol Mol Biol Rev*. 79(4):387-401. doi: 10.1128/MMBR.00027-15.

Poetini S, Pinheiro FC, Trindade de Paula e Marina Prigol. (2015). Avaliação parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas em um município da fronteira oeste, Rio grande do sul, Brasil. *Rev Patol Trop* Vol. 44 (2): 163-169.

Poiroux, Gonord F, Bidel LP, Fanciullino AL, Gautier H, Lauri-Lopez F, Urban L. (2010). Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *J Agric Food Chem* 2010, 58(23):12065–12082.

Quevedo f y Takur A S. (1980). Parasitosis transmitidas por alimentos. Buenos Aires. Centro Panamericano de Zoonosis. (*Serie de Monografías Científicas y Técnicas.* CP2.12).

Quílez J, Sánchez-Acedo C, del Cacho E, Clavel A, Causapé AC. (1996). Prevalence of *Cryptosporidium and Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). *Vet Parasitol*; 66: 139-46.

Ramírez, J. D., Flórez, C., Olivera, M., Bernal, M. C., & Giraldo, J. C. (2017). *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PloS one, 12* (2), e0172586.

Ramírez, J. D., Sánchez, A., Hernández, C., Flórez, C., Bernal, M. C., Giraldo, J. C... Vicuña, Y. (2016). Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infection, Genetics and Evolution, 41,* 32-35.

Ramírez, J. D., Sánchez, L. V., Bautista, D. C., Corredor, A. F., Flórez, A. C., & Stensvold, C. R. (2014). *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infection, Genetics and Evolution, 22,* 223-228.

Rea, María J. F. - Fleitas, Adriana - Borda, C. Edgardo (2004). Existencia de parásitos intestinales en hortalizas que se comercializan en la ciudad de Corrientes, Argentina. *Universidad nacional del nordeste, comunicaciones científicas y tecnológicas.* Resumen: M-102.

RMETD (Red Mundial de Enfermedades Tropicales Desatendidas), Banco Interamericano de Desarrollo, Organización Panamericana de la Salud, Instituto de Vacunas Sabin. (2011). Un Llamado a la Acción: Hacer frente a los helmintos transmitidos por el contacto con el suelo en Latino América y el Caribe. Washington, D.C: *Centro para el Estudio de la Globalización de The George Washington University*; p. 38.

Rochelle, P.A., Ferguson, D.M., Handojo, T.J., Deleon, R., Stewart, M.H., Wolfe, R.L., (1997). An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2029–2037.

Rodríguez V, Espinosa O, Carranza JC, et al. (2014). Genotipos de *Giardia duodenalis* en muestras de niños de las guarderías del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar y de perros en Ibagué, Colombia. *Biomédica*; 34:271-81.

Romero R. (1993). Microbiología y parasitología Humana. *Editorial medica panamericana,* Mexico D.F.

Rosenthal B. (2008). A family tree for *Toxoplasma*. *Agric Res* 56(8): 18-20.

Rostami Ali, Mayam Ebrahimi et al. (2016). Contamination of commonly consumed raw vegetables with soil transmitted helminth eggs in mazandaran province, northern Iran. *International journal of Food Microbiology.* Vol 225, 54-58.

Ryan U, Nawal Hijjawi, Yaoyu Feng, Lihua Xiao. (2019). *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. *International Journal for Parasitology. 49, 1–11.*

Salant H, Spira DT. (2004). A crosssectional survey of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Jerusalem cats. *Vet Parasitol* 124: 167-177.

Salomón EB, Brandl MT, Mandrell RE. (2008). Papel de las buenas prácticas agrícolas en la inocuidad de las frutas y verduras. En: Matthews KR. Microbiología de frutas y verduras. Zaragoza: *Ed. Acribia, S.A*.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. (N. Ford, C. Nolan, & M. Ferguson, Eds.) (2nd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez, A., Munoz, M., Gómez, N., Tabares, J., Segura, L., Salazar, Á... Xiao, L. (2017). Molecular epidemiology of *Giardia, Blastocystis* and *Cryptosporidium* among Indigenous children from the Colombian Amazon basin. *Frontiers in microbiology,* 8, 248-261.

Santana Ligia R., Rosemary d.s. Carvalho, Clicia Capibaribe Leite, Leda Maria Alcântara, et al. (2006). Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas decultivo. *Cienc, Tecnol, Aliment, Campinas.* 26(2): 254-269.

Sanzón F, Vela JC, Valencia HF, Montenegro L. (1999). Una estrategia antiparasitaria original en Arboleda, Nariño. *Colomb Médica*. 30(3):112-7.

Savioli, L., Smith, H. & Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology, 22*(5), 203-208.

Slifko, T. R., Smith, H. V., & Rose, J. B. (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*, *30*(12–13), 1379–1393. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00128-4.

Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. (1996). Human parasite finds taxonomic home. *Nature*; 380:398.

Silva CGM, Andrade SAC, Stamford TLM. (2005). Ocorrência de *Cryptosporidium spp*. e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura*, no Recife. *Ciência & Saúde*. 10:63-9.

Silva, L. A., Andrade, R. O., Carneiro, A. C., & Vitor, R. (2014). Overlapping Toxoplasma gondii genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. *PLoS ONE*, *9*(2), 3–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090237.

Sio SW, Puthia MK, Lee AS, Lu J, Tan KS. (2006). Protease activity of *Blastocystishominis*. *Parasitol Res*. 99(2): 126-130.

Slavin JL, Lloyd B. (2012). Health benefits of fruits and vegetables. *Adv Nutr* 2012, 3(4):506–516.

Smith HV, Cacciò SM, Cook N, Nichols RA, Tait A. (2007). Cryptosporidium and Giardia as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol*; 149: 29-40.

Smith HV, Nichols RAB, Grimason AM. (2005). *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting the guts of the matter. *Trend parasitol*; 21: 133-42.

Soares B, Cantos GA. (2006). Detecção de estruturas parasitárias em hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, SC, Brasil. RBCF. 42: 455- 460.

Soares B, Cantos GA. (2007). Detecção de estruturas parasitárias em hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, SC, Brasil. *RBCF*;42: 455- 460.

Su, C., Evans, D., Cole, R. H., Kissinger, J. C., Ajioka, J. W., & Sibley, L. D. (2003). Recent Expansion of Toxoplasma Through Enhanced Oral Transmission. *Science*, *299*(5605), 414–416. https://doi.org/10.1126/science.1078035.

Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, Yoshikawa H, Clark CG. (2007). Terminology for *Blastocystis* subtypes- -a consensus. *Trends Parasitol*; 23(3):93-6.

Stensvold CR. (2013). Blastocystis: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Trop Parasitol*. 3(1):26-34.

Stensvold, C. R., Christiansen, D. B., Olsen, K. E. P., & Nielsen, H. V. (2011). *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *The American journal of tropical medicine and hygiene, 84* (6), 883-885.

Stensvold, R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H. V., & Arendrup, M. C. (2006).

Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *Journal of Parasitology, 92* (5), 1081-1087.

Stenzel D, Boreham P, Mcdougall R. (1991). Ultrastructure of Blastocystis hominis in human stool samples. *Int. J Parasitol;* 21:807–812.

Stenzel D, Boreham P. (1996). Blastocystis hominis, *revisited Clin Microbiol Rev*; 9:563.

Struelens MJ, Palm D, Takkinen J. (2011). Actualización del Brote de STEC de Alemania. Características de las cepas y propuesta diagnóstica. http://www.anlis.gov.ar/brote-de-stec/ActualizacionBrote24_06_11.pdf.

Sturrock HJW, Picon D, Sabasio A, Oguttu D, Robinson E, Lado M, et al. (2009). Integrated mapping of neglected tropical diseases: *epidemiological findings and control implications for northern Bahr-el-Ghazal State, Southern Sudan*. PLoS Negl Trop Dis; 3(10):e537.

Takayanagui O.M., Divani M. Capuano, Carlos A. D. Oliveira, Alzira M.M. Bergamini, Madalena H.T. et al. (2007). Avaliação da contaminação de hortas produtoras de verduras após a implantação do sistema de fiscalização em Ribeirão Preto, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(2):239-241.

Takayanagui OM, Capuano DM, Oliveira CAD, Alzira M.M. Bergamini AMM, Okino MHT, Silva AMCC, Maria A. Oliveira MA, Ribeiro EGA, Takayanagui AMM. (2006). Análise da cadeia de produção de verduras em Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop.* 39: 224-226.

Takayanagui OM, Febrônio LHP, Bergamini AM, Okino MHT, Ana A.M.C. Castro AAMC, Santiago R, Capuano DM, Oliveira MA, Takayanagui AMM. (2000). Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop* ;33: 169-174.

Takayanagui OM, Oliveira CD, Bergamini AMM, Capuano DM, Okino MHT, Febronio LHP, Castro e Silva AAMC, Oliveira MA, Ribeiro EGA, Takayanagui AMM. (2001). Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. Rev *Soc Bras Med Trop.* 34: 37-41.

Takayanagui OM, Oliveira CD, Bergamini AMM, Capuano DM, Okino MHT, Febronio LHP, Castro e Silva AAMC, Oliveira MA, Ribeiro EGA, Takayanagui AMM. (2001). Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. *Rev*

Soc Bras Med Trop. 34: 37-41.

Tan KS. (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis spp. Clin Microbiol Rev*. 21(4): 639-665.

Tan T, Suresh KG, Smith HV. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of *Blastocystishominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential. *Parasitol Res*. 104(1): 85-93.

Tan TC, Suresh KG. (2006). Predominance of amoeboid forms of *Blastocystishominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitol Res*. 98(3): 189-193.

Tan, K. S. (2004). *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Veterinary parasitology, 126* (1-2), 121-144.

Tan, K. S. W. (2008). New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of Blastocystis spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 639–665. doi:10.1128/CMR.00022-08.

Tan, K. S. W. (2008). New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of Blastocystis spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 639–665. doi:10.1128/CMR.00022-08.

Tananta VIV. (2002). Presencia de enteroparasitos en lechuga (Lactuca sativa) en establecimientos de consumo público de alimentos del distrito del Cercado de Lima. *[Tesis de Licenciatura]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*

Tay Zavala J. (1993). Microbiología y parasitología Médicas. *Méndez editores*, México D.F.

The Royal Society. (2011). Knowledge, Networks and Nations: Global scientific collaboration in the 21st century. (xx ed.). Londres, Inglaterra: *Excelent in Science.*

Thompson, R.C.A., Palmer, A., Carlysle, S. & O'handley, R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Veterinary Journal, 177(1*), 18-25.

Tórtora JCO, Uchoa CM, Farage S. (2003). Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurantes self-service, de Niterói, RJ. *Rev Soc Bras Med Trop*. 36:535-7.

Traviezo-Valles L, Dávila J, Rodríguez R, Perdomo O, Pérez J. (2005) Contaminación enteroparasitaria de lechugas expendidasen mercados del estado Lara. Venezuela.

Parasitol Latinoam ; 59:167 - 170.

Traviezo-Valles L, Dávila J, Rodríguez R, Perdomo O, Pérez J. (2004). Contaminación enteroparasitaria de lechugas expendidasen mercados del estado Lara. Venezuela. *Parasitol Latinoam.* 59:167 - 170.

Triviño-Valencia, J., Lora-Suárez, F. M., Zuluaga, J. D., & Gomez-Marin, J. E. (2016). Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. *Parasitology Research*, *115*(5), 1789–1797. https://doi.org/10.1007/s00436-016-4917-5.

Tzipori S, Ward H. (2002). Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect*; 4: 1047-58.

Uga S, Matsuo J, Kono E, Kimura K, Inoue M, Rai SK, et al. (2000). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocyst shedding in calves in Japan.*Vet Parasitol*; 94: 27-32.

Valderrama J. (2013). *Encuesta nacional de parasitismo intestinal en población escolar, fase II.* Republica República de Colombia: Ministerio de salud y protección social.

Vallada EP. (1997). Manual de exame de fezes. São Paulo: *Atheneu.* 34: 721-765.

W.H.O. (2006). Quimioterapia preventiva para las helmintiasis humanas. Uso coordinado de medicamentos antihelmínticos: *Manual para profesionales de la Salud y Gerentes de Programa.*

Wade SE, Mohammed HO, Schaaf SL. (2000). Prevalence of *Giardia sp., Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* (syn. C. muris) dairy herds in five counties of southeastern New York. *Vet Parasitol*; 93: 1-11.

Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F. (2011). *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis.* 45: 235-242.

Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Dionigia, M., Texier, C., Delbac, F., & Alaoui, H. E. (2013*). Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 1(5), 167–178.

WEB de la Alcaldía Municipal de Ibagué. (2018). Alcaldia Municipal de Ibagué/ Localización. Recuperado a partir de http://www.ibague.gov.co/portal/seccion/contenido/index.php?type=3&cnt=53.

Weiss, L., & Dubey, J. (2009). Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*, *39*(8), 895–901. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004.Toxoplasmosis.

Xiao L. (2009). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an up. *Exp Parasitol*, doi: 10.1016/j.exppara.2009. 03.018.

Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata, I., Iseki, M., Ali, I. K. M., Hossain, M. B... Takahashi, Y. (2004). Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitology research, 92* (1), 22-29.

Zaman V, Howe J, Ng M, Goh TK. (1999). Scanning electron microscopy of the surface coat of Blastocystis hominis. *Parasitol Res*. 85(12): 974-976.

Zierdt CH, Rude WS. (1967). Bull BS Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis.* Am J Clin Pathol; 48:495.

Zierdt CH, Swan JC, Hosseini J. (1983). In vitro response of *Blastocystis hominis* to antiprotozoal drugs. *J Protozool*; 30:332–334.

Zierdt CH, Tan HK. (1976). Ultrastructure and light microscope appearance of *Blastocystis hominis* in a patient with enteric disease. *Z Parasitenkd*. 50:277–283.

Zierdt CH. (1991). *Blastocystis hominis* past and future. *Clin Microbiol Rev*; 4:61–79.

ANEXOS

Anexo A. Formato de recolección y control, con datos correspondientes a las 100 muestras estudiadas.

Abreviaciones			
C	Cilantro	**CL**	Cebolla larga
LL	Lechuga lisa	**A**	Apio
Z	Zanahoria	**Bl**	*Blastocystis* spp
LC	Lechuga crespa	**G**	*Giardia duodenalis*
F	Fresas	**T**	*Toxoplasma*

Nº	Código de muestra	Fecha recolección	Localidad	Parásitos *Bl-G-C-T (Subtipo Bl)*
1	C	18/01/17	Plaza 21	
2	LL	18/01/17	Plaza 21	**BL/T (3)**
3	LC	18/01/17	Plaza 21	
4	Z	18/01/17	Plaza 21	
5	F	18/01/17	Plaza 21	
6	A	18/01/17	Plaza 21	**T**
7	CL	18/01/17	Plaza 21	
8	C	9/03/17	Super inter 37	**T**
9	LL	9/03/17	Super inter 37	**BL (1)**
10	LC	9/03/17	Super inter 37	
11	Z	9/03/17	Super inter 37	**G**
12	F	9/03/17	Super inter 37	**G**
13	A	9/03/17	Super inter 37	
14	CL	9/03/17	Super inter 37	
15	C..	10/09/17	Supermercado Éxito	**BL/T (3)**
16	LL..	10/09/17	Supermercado Éxito	
17	Z	10/09/17	Supermercado Éxito	

18	LC	10/09/17	Supermercado Éxito	**G**
19	F	10/09/17	Supermercado Éxito	**BL/T (1)**
20	CL	10/09/17	Supermercado Éxito	
21	A	10/09/17	Supermercado Éxito	
22	C	5/12/17	Plaza de la 14	**BL (2)**
23	LL	5/12/17	Plaza de la 14	**BL (3)**
24	Z	5/12/17	Plaza de la 14	
25	LC	5/12/17	Plaza de la 14	
26	F	5/12/17	Plaza de la 14	**G**
27	A	5/12/17	Plaza de la 14	**T**
28	CL	5/12/17	Plaza de la 14	
29	C	27/12/17	Mercacentro nº 4	**BL (1)**
30	LL	27/12/17	Mercacentro nº 4	
31	Z	27/12/17	Mercacentro nº 4	**G**
32	F	27/12/17	Mercacentro nº 4	**BL (1)**
33	A	27/12/17	Mercacentro nº 4	
34	CL	27/12/17	Mercacentro nº 4	**BL (2)**
35	LC	27/12/17	Mercacentro nº 4	**T**
36	C	18/01/18	Fruver la Granja 40	**T**
37	LL	18/01/18	Fruver la Granja 40	
38	Z	18/01/18	Fruver la Granja 40	
39	F	18/01/18	Fruver la Granja 40	
40	A	18/01/18	Fruver la Granja 40	**G**
41	CL	18/01/18	Fruver la Granja 40	**T**
42	LC	18/01/18	Fruver la Granja 40	
43	C	31/01/18	Super. Popular	
44	LL	31/01/18	Super. Popular	
45	Z	31/01/18	Super. Popular	

45	F	31/01/18	Super. Popular	
46	A	31/01/18	Super. Popular	**BL (1)**
47	CL	31/01/18	Super. Popular	
48	LC	31/01/18	Super. Popular	
49	C	7/02/18	Super. Metro	**T**
50	LL	7/02/18	Super. Metro	
51	Z	7/02/18	Super. Metro	
52	F	7/02/18	Super. Metro	
53	A	7/02/18	Super. Metro	
54	CL	7/02/18	Super. Metro	**BL (3)**
55	LC	7/02/18	Super. Metro	
56	C	14/02/18	Fruver Boquerón	**T**
57	LL	14/02/18	Fruver Boquerón	**BL/T (1)**
58	Z	14/02/18	Fruver Boquerón	
59	F	14/02/18	Fruver Boquerón	**T**
60	A	14/02/18	Fruver Boquerón	**T**
61	CL	14/02/18	Fruver Boquerón	**T**
62	LC	14/02/18	Fruver Boquerón	
63	C	27/03/18	Plaza de la 28	**BL/T (1)**
64	LL	27/03/18	Plaza de la 28	
65	Z	27/03/18	Plaza de la 28	
66	F	27/03/18	Plaza de la 28	**T**
67	A	27/03/18	Plaza de la 28	
68	CL	27/03/18	Plaza de la 28	**T**
69	LC	27/03/18	Plaza de la 28	**G**
70	C	26/04/18	Super. Olímpica	
71	LL	26/04/18	Super. Olímpica	
72	Z	26/04/18	Super. Olímpica	

73	F	26/04/18	Super. Olímpica	**BL (2)**
74	A	26/04/18	Super. Olímpica	
75	CL	26/04/18	Super. Olímpica	
76	LC	26/04/18	Super. Olímpica	
77	C	8/05/18	Surti plaza salado	
78	LL	8/05/18	Surti plaza salado	**T**
79	Z	8/05/18	Surti plaza salado	
80	F	8/05/18	Surti plaza salado	
81	A	8/05/18	Surti plaza salado	
82	CL	8/05/18	Surti plaza salado	
83	LC	8/05/18	Surti plaza salado	**BL (2)**
84	C	22/05/18	Plaza jardín	
85	LL	22/05/18	Plaza jardín	**G/T**
86	Z	22/05/18	Plaza jardín	
87	F	22/05/18	Plaza jardín	**BL (2)**
88	A	22/05/18	Plaza jardín	**BL (1)**
89	CL	22/05/18	Plaza jardín	
90	LC	22/05/18	Plaza jardín	**T**
91	C	24/05/18	Plaza de la 21	
92	LL	24/05/18	Plaza de la 21	**BL (1)**
93	Z	24/05/18	Plaza de la 21	
94	F	24/05/18	Plaza de la 21	**T**
95	A	24/05/18	Plaza de la 21	
96	CL	24/05/18	Plaza de la 21	
97	LC	24/05/18	Plaza de la 21	**BL (2)**
98	C	3/06/18	Plaza de la 14	
99	LL	3/06/18	Plaza de la 14	
100	Z	3/06/18	Plaza de la 14	

Anexo B. Consentimiento informado para toma de muestras del Laboratorio Clínico Naizir, para el uso de material biológico en el estudio.

NAIZIR LABORATORIO CLINICO

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRAS

CÓDIGO: TM-FR-09
VERSIÓN: 05
VIGENTE DESDE: 25/07/2018

ADMISIONES _____ FECHA: _____

¿QUÉ ES Y PARA QUÉ SE REALIZA LA TOMA DE MUESTRAS?
La toma de muestras consiste en recoger una muestra biológica de su organismo. Las muestras más solicitadas son: sangre, orina, heces y esputo, aunque pueden recogerse otras. Los exámenes pueden dar información muy útil sobre su diagnóstico o la evolución de su enfermedad lo que permitirá un tratamiento médico más adecuado. Tan importante como su obtención es el manejo de la muestra, por lo que existen normas estrictas para la correcta recogida, manipulación, transporte y conservación de la muestra, así como para su adecuado procesamiento en laboratorio.

¿QUÉ RIESGOS PUEDE HABER?
La toma de la muestras apenas presenta riesgos. Para garantizar la seguridad del paciente, usted será atendido por personal capacitado y bajo condiciones de seguridad y de asepsia rigurosa.

Riesgos frecuentes: En el caso de la toma de muestra sanguínea, puede producirse un mínimo hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel del pinchazo), por lo que será conveniente que después se realice presión sobre la zona puncionada. También puede presentarse sangrado excesivo, desmayo o sensación de mareo, infección (menos frecuente y puede presentarse cuando hay ruptura excesiva de piel) y parestesia (sensación de hormigueo y/o corrientazo). Algunas muestras microbiológicas como cultivos o secreciones vaginales o uretrales pueden causar ligera molestia con sensación de irritación. El resto de las muestras habitualmente recogidas (orina, esputos, heces, etc) no presentan riesgos y son tomadas por el paciente.
Riesgos infrecuentes: En algunos pacientes, por sus características individuales, resulta difícil extraer la muestra de sangre, por lo que tal vez sea necesario repetidas veces hasta obtener la muestra de sangre. Otros riesgos o complicaciones pueden aparecer, dada su situación clínica y sus circunstancias personales.

¿QUÉ CONSECUENCIAS TRAE LA NO REALIZACIÓN? La consecuencia será que la información que requiere su médico para su adecuada atención será menor, lo que puede mermar sus cuidados en salud.
Si después de leer detenidamente este documento desea más información, por favor, no dude en preguntar. Se le atenderá con mucho gusto.

ESPACIO SOMBREADO PARA USO EXCLUSIVO DEL LABORATORIO

ENTREVISTA AL PACIENTE

1.) Condiciones al ingresar a la toma de muestra (si se encuentra acompañado, estado físico evidente, estado de animo)

2.) Antecedentes médicos: _____

3.) Medicamentos usados: _____

4.) Observaciones: _____

5.) Exámenes Pendientes _____

6.) Entrega de Resultados _____



VENAS PARA LA PUNCION

Expreso que el LABORATORIO CLINICO NAIZIR LTDA. me ha explicado de forma satisfactoria el objetivo del procedimiento que se me realizará y sus beneficios. También he sido informado sobre la preparación para el examen, molestias y riesgos derivados de su realización, la fecha de entrega y garantía de confidencialidad de mis resultados, mis deberes y derechos como paciente así mismo autorizo en caso necesario, el envío de mis muestras a otros laboratorios de la Red de Apoyo del Laboratorio Clínico Naizir Ltda. Por tal razón declaro estar debidamente informado(a), según la ley 23 de 1981 (normas sobre Ética Médica), para formular todas las preguntas que he creído conveniente y me han informado de mi derecho a retirar este consentimiento en cualquier momento, con documento escrito dirigido al Laboratorio Clínico Naizir Ltda. Declaro estar en plena capacidad legal, física y mental por lo cual doy mi consentimiento de forma libre y voluntaria para los aspectos anteriormente mencionados. Autorizo de manera voluntaria, previa, explícita, informada e inequívoca para tratar mi información personal, de acuerdo con la política de tratamiento de datos personales y para los fines relacionados con su objeto social y en especial para fines legales, contractuales y comerciales descritos en ella; y por tanto me comprometo a leer el aviso de privacidad y la política mencionada disponible en: *www.laboratorionaizir.com*. La información obtenida para el Tratamiento de mis datos personales y consignada en la presente autorización la he suministrado de forma voluntaria y es verídica (NOTA: Por favor diligencie este documento con su nombre, identificación y firma): **En caso de no saber firmar, favor poner huella digital en el espacio disponible.**

El paciente (nombres y apellidos) _____

Documento: _____ FIRMA _____ HUELLA

PARA PERSONAS QUE REQUIEREN ACOMPAÑANTE Yo, _____ mayor de edad, identificado con C.C. _____, actuando como acompañante y/o representante legal del paciente _____ doy mi consentimiento de forma libre y voluntaria para los aspectos anteriormente mencionados.

FIRMA ACOMPAÑANTE _____

HORA RECEPCIÓN _____ HORA TOMA DE MUESTRA _____

Firma del personal de Laboratorio _____

NAIZIR LABORATORIO CLINICO

FECHA: _____

NOMBRE: _____

RESULTADO CONFIDENCIAL SI ☐ NO ☐

ADMISIONES: _____

SOLICITE EN RECEPCION ENTREGA DE RESULTADOS POR INTERNET O A DOMICILIO

HORARIO DE ENTREGA DE RESULTADOS
LUNES A VIERNES 11:00 AM A 12:00 M - 2:00 PM A 5:00 PM.
SABADO 9:00 AM A 12:00 M

EXAMEN PENDIENTE: _____

NOTA: EL TIEMPO PARA LA ENTREGA DE MUESTRAS PENDIENTES AL LABORATORIO CLINICO NAIZIR LTDA. ES DE 15 DÍAS CALENDARIO.

FECHA ENTREGA RESULTADOS A PARTIR DE _____

Calle 33 No. 4A - 44 B/. Cádiz - Ibagué LINEAS DE ATENCION AL USUARIO: 2643079 - 2651503 www.laboratorionaizir.com E-mail: laboratorionaizir@hotmail.com

Anexo C. Método de flotación con sulfato de zinc, modificado para concentración de quistes en material vegetal (Faust et al., 1938).

1. Diluir el sedimento obtenido del lavado de vegetales en 10 ml de agua destilada.
2. Filtrar a través de dos capas de gaza en un tubo falcon.
3. Centrifugar durante dos minutos a 4000 rpm.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 10 ml de agua destilada.
5. Centrifugar durante dos minutos a 4000 rpm.
6. Repetir los pasos 4 y 5 hasta que el sobrenadante este limpio.
7. Eliminar sobrenadante y adicionar 4 ml de solución de Sulfato de Zinc (1.18).
8. Resuspender el pellet y adicionar solución de $ZnSO_4$ hasta un centímetro por debajo del borde del tubo falcon.
9. Centrifugar durante dos minutos a 4000 rpm.
10. Llenar el tubo con solución $ZnSO_4$ hasta el borde y colocar una laminilla cubreobjetos. Dejar en reposo durante 5 minutos.
11. Recoger la gota adherida a la laminilla con una micropipeta y depositarla en un tubo eppendorf.
12. Ubicar de nuevo la laminilla en el borde del tubo y dejar en reposo 5 minutos.
13. Repetir los pasos 11 y 12 cinco veces.
14. Resuspender en 50 µl de TE y almacenar a 4ºC.

Preparación de la solución de Sulfato de Zinc (Densidad: 1.18)

1. Pesar 330 g de ZnSO4.
2. Medir 700 ml de H_2Odd y adicionarlo al erlenmeyer.
3. Calentar para facilitar la disolución.
4. Adicionar otros 250 ml de H_2Odd y mezclar. Volumen total (950 ml).
5. Medir el pH y refrigerar.

Nota: Ajustar la densidad del sulfato (1.15: Agregar más sulfato de zinc. 1.28: Agregar más agua destilada).

Anexo D. Protocolo de extracción de ácidos nucleicos por Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (FCAI).

Extracción de ácidos nucleicos por FCAI

- A 500 µl de muestra digerida, adicionar el mismo volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- Mezclar por inversión suavemente durante 5 minutos.
- Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 3 minutos.
- Colocar el sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo y agregar un volumen igual de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1).
- Mezclar por inversión durante 5 minutos
- Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 3 minutos.
- Colocar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo, agregar 10% de volumen de acetato de sodio 3 M y el doble de volumen de etanol absoluto frio.
- Mezclar por inversión.
- Colocar el tubo en cama de hielo durante 15 minutos.
- Centrifugar a 14000 r.p.m. durante 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Adicionar 500 µl de etanol al 70%.
- Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante, dejar secar el pellet y agregar 50 µl de TE (Tris-EDTA, pH 8.0).
- Almacenar a 4 °C. Hasta la purificación

Purificación de ADN por Fenol Cloroformo Alcohol-Isoamílico

- Adicionar a la muestra 450 µl de H_2Odd y 2,5 µl de ribonucleasa A (Solución de trabajo 50 µg/ml).
- Dejar en digestión en baño María durante 1 hora a 37°C.

- Repetir el procedimiento de extracción por el método Fenol- Cloroformo- Alcohol Isoamílico.
- Resuspender en 50 µl de TE (Tris-EDTA pH 8.0)
- Almacenar a 4°C

Preparación de FCAI (25:24:1) y CAI (24:1)

- Para un volumen de 100 ml de FCAI, adicionar 50 ml de fenol saturado con Tris-HCl, 48 ml de cloroformo y 2 ml de alcohol Isoamílico.
- Para un volumen de 100 ml de CAI, mezclar 96 ml de cloroformo y 4 ml de alcohol Isoamílico

Preparación de acetato de sodio 3M pH 5,2 (100 ml)

Pesar 40,81 g de Acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$. $3H_2O$) y llevar a 100 ml de H_2Odd. Medir y ajustar el pH a 5,2 con ácido acético glacial, y autoclavar a 15 Lb durante 10 minutos.

Preparación de TE (50 ml)

Mezclar 0,5 ml de Tris-HCl 1M pH 8 y 0,1mL EDTA 0,5M pH 8. Adicionar 49,4 ml de H_2Odd.

Fuente: LIPT

Anexo E. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%

Componentes para preparar gel de acrilamida al 6%

Reactivos	**Volumen**	
	10ml	**12ml**
H_2Odd (ml)	6	7,2
Acrilamida 30% (ml)	2	2,4
TBE 5X (ml)	2	2,4
Persulfato de amonio (µl)	80	84
TEMED (µl)	4	4,2

Fuente: LIPT

Procedimiento:

- Limpiar vidrios, separadores y cauchos con agua desionizada y etanol 70%, secar con un paño limpio.
- Ensamblar la cámara molde del gel de poliacrilamida.
- Adicionar agua a la cámara, esperar de 1 a 3 minutos, para verificar que no haya filtración. Seguidamente retirar el agua y secar la.
- Mezclar en un recipiente de vidrio limpio los componentes del gel de poliacrilamida.
- Servir la solución de poliacrilamida en la cámara de electroforesis, colocar el peine adecuado teniendo en cuenta que no se formen burbujas.
- Esperar a que el gel se polimerice.
- Adicionar buffer de carga a las muestras (1 µl de buffer de carga 6X por cada 5 µl de muestra)
- Retirar el peine, lavar las canaletas con agua desionizada y TBE 1X nuevo utilizando jeringa para retirar el exceso de acrilamida.
- Realizar el montaje de la cámara molde en la cámara de electroforesis, agregar TBE 1X en los contenedores de la cámara.
- Sembrar aproximadamente 4 µl de muestra en cada canaleta.

- Conectar los cables a la fuente de poder y dejar a 80 voltios (El tiempo del corrido varía dependiendo del tamaño del gel fragmento y el área del gel)-

Preparación de acrilamida al 30%

Componentes de la Acrilamida al 30%

Componente	**100 ml**
Acrilamida	29(g)
NN-metilen-bisacrilamida	1(g)
H_2Odd	Aforar a 100 (ml)

Fuente: LIPT

Procedimiento:

- Pesar los componentes y se adicionan en un frasco previamente rotulado con la cantidad de H_2Odd a utilizar. Es necesario usar doble guante, tapaboca, careta y bata manga larga como medidas de protección para pesar los componentes, ya que la acrilamida es neurotóxica.
- Adicionar H_2Odd y llevar a baño de maría a 37 ^oC hasta que se disuelva.
- Cubrir con papel aluminio el frasco, rotularlo y almacenarlo a 4 ^oC

Preparación de persulfato de amonio 10%: Pesar 1g de persulfato de amonio y llevar a 10ml con H_2Odd.

Protocolo coloración con nitrato de plata para geles de poliacrilamida al 6%: Componentes de las soluciones usadas para la coloración de geles de poliacrilamida al 6%

Solución Fijadora	
Etanol absoluto	40ml
Ácido acético	1ml
H_2Odd	Llevar a 400 ml
Solución con Nitrato de Plata	

Nitrato de plata	0,15 g
Solución fijadora	50 ml
H_2Odd	100 ml
Solución Reveladora	
Formaldehido	1 ml
H_2Odd	140 ml
NaOH	2 g

Fuente: LIPT

Procedimiento:

- Preparar cada una de las soluciones (Fijadora, nitrato de plata y reveladora).
- Cuando el corrido haya finalizado, adicionar la solución fijadora en una bandeja limpia y en ella colocar el gel de poliacrilamida. Desmontar el gel de poliacrilamida retirando los vidrios, verificar la orientación del gel.
- Agitar suavemente durante 5 minutos
- Retirar la solución fijadora y adicionar la solución de nitrato de plata. Agitar suavemente durante 10 minutos.
- Retirar la solución de nitrato de plata, lavar rápidamente con agua desionizada. Seguidamente, retire el agua.
- Adicionar la solución reveladora y agitar constantemente hasta que sean visibles las bandas y el gel tomé la tonalidad deseada.
- Retirar la solución de revelado y adicionar solución fijadora.
- Para fijar el gel, se humedece una hoja de papel celofán con solución fijadora y se cubre un vidrio de montaje. sobre este, se coloca el gel y encima otra hoja de papel celofán humedecido. Evitar la formación de burbujas; una vez deshidratado el gel despegar y recortar.

NOTA: No adicionar las soluciones directamente sobre el gel y no toque el gel durante el proceso de coloración.

Anexo F. BLAST descriptivo de los primers usados en la detección de *Giardia duodenalis* (1), *Blastocystis* spp (2), *Toxoplasma gondii* (3) y *Cryptosporidium* spp (4).

1.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:40

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Giardia intestinalis isolate S8C5 beta-giardin gene, partial cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	KY612242.1
Giardia intestinalis isolate CD32 beta-giardin gene, partial cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	KY979500.1
Giardia intestinalis strain VANC/96/UBC/126 beta-giardin (bg) gene, partial cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	KP687765.1
Giardia intestinalis voucher VANC/90/UBC/62 beta-giardin (bg) gene, complete cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	KM190700.1
Giardia intestinalis voucher VANC/85/UBC/2 beta-giardin (bg) gene, complete cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	KM190682.1
Giardia intestinalis voucher VANC/90/UBC/57 beta-giardin (bg) gene, complete cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	KM190678.1
Giardia intestinalis clone 46c2 beta giardin (bg) gene, partial cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	HQ179591.1
Giardia intestinalis clone 2c2 beta giardin (bg) gene, partial cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	HQ179590.1
Giardia intestinalis isolate GL784 clone d beta giardin gene, partial cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	FJ971423.1
Giardia intestinalis isolate GL784 clone c beta giardin gene, partial cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	FJ971422.1
Giardia intestinalis isolate GL784 clone b beta giardin gene, partial cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	FJ971421.1
Giardia intestinalis isolate GL784 clone a beta giardin gene, partial cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	FJ971420.1
Giardia intestinalis isolate GL448 beta giardin gene, partial cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	FJ971417.1
Giardia intestinalis isolate GLA20 beta giardin gene, partial cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	FJ971410.1
Giardia intestinalis isolate GL88 clone a beta giardin gene, partial cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	FJ971409.1
Giardia intestinalis isolate H2-001 beta-giardin gene, partial cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	FJ009208.1
Giardia lamblia ATCC 50803 Hypothetical protein (GL50803_32265) mRNA, complete cds	52.8	52.8	52%	6e-04	100.00%	XM_001705374.1

2.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:100

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Blastocystis hominis isolate B.h IR-MAZ 7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.7	54.7	51%	2e-04	100.00%	KU359221.1
Blastocystis hominis isolate B.h IR-MAZ 6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.7	54.7	51%	2e-04	100.00%	KU359220.1
Blastocystis hominis isolate B.h IR-MAZ 5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.7	54.7	51%	2e-04	100.00%	KU359219.1
Blastocystis hominis isolate B.h IR-MAZ 4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.7	54.7	51%	2e-04	100.00%	KU359218.1
Blastocystis hominis isolate B.h IR-MAZ 3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.7	54.7	51%	2e-04	100.00%	KU359217.1
Blastocystis hominis isolate B.h IR-MAZ 2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.7	54.7	51%	2e-04	100.00%	KU359216.1
Blastocystis hominis isolate B.h IR-MAZ 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	54.7	54.7	51%	2e-04	100.00%	KU359215.1
Blastocystis hominis partial 18S rRNA gene, isolate cluster B	54.7	54.7	51%	2e-04	100.00%	AM118079.1
Blastocystis hominis partial 18S rRNA gene, isolate cluster A	54.7	54.7	51%	2e-04	100.00%	AM118078.1
Blastocystis hominis partial 18S rRNA gene, isolate cluster C	54.7	54.7	51%	2e-04	100.00%	AM117938.1
Blastocystis sp. isolate 75Sumid small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complet	52.8	52.8	57%	6e-04	96.88%	MH668258.1
Blastocystis sp. isolate 1Sumid small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete	52.8	52.8	57%	6e-04	96.88%	MH668256.1
Blastocystis sp. subtype 3 isolate ZOTU203 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	52.8	52.8	57%	6e-04	96.88%	MH623044.1
Blastocystis sp. isolate HH5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	52.8	52.8	50%	6e-04	100.00%	MK418914.1
Blastocystis sp. isolate 217BL-P small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	52.8	52.8	50%	6e-04	100.00%	MG214885.1
Blastocystis sp. isolate 128BL-P small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	52.8	52.8	50%	6e-04	100.00%	MG214883.1
Blastocystis sp. isolate 107BL-P small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	52.8	52.8	50%	6e-04	100.00%	MG214881.1

3.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Toxoplasma gondii isolate M508_13 B1 gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KU288755.1
☐	Toxoplasma gondii B1 (b1) gene, partial cds	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KR559682.1
☐	Toxoplasma gondii GRA6 gene for granule antigen protein GRA6, partial sequence, isolate: I	40.1	40.1	100%	0.29	100%	AB743597.1
☐	Toxoplasma gondii GRA6 gene for granule antigen protein GRA6, partial sequence, isolate: I	40.1	40.1	100%	0.29	100%	AB743595.1
☐	Toxoplasma gondii GRA6 gene for granule antigen protein GRA6, partial sequence, isolate: I	40.1	40.1	100%	0.29	100%	AB743593.1
☐	Toxoplasma gondii GRA6 gene for granule antigen protein GRA6, partial sequence, isolate: I	40.1	40.1	100%	0.29	100%	AB743592.1
☐	Toxoplasma gondii isolate Coalatilla184 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, par	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KX270388.1
☐	Toxoplasma gondii isolate Tecuanillo179 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, ps	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KX270387.1
☐	Toxoplasma gondii isolate Tecuanillo178 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, ps	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KX270386.1
☐	Toxoplasma gondii isolate Tecuanillo177 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, ps	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KX270385.1
☐	Toxoplasma gondii isolate Tecuanillo175 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, ps	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KX270384.1
☐	Toxoplasma gondii isolate Tecuanillo174 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, ps	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KX270383.1
☐	Toxoplasma gondii isolate Coalatilla173 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, par	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KX270382.1
☐	Toxoplasma gondii isolate Coalatilla170 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, par	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KX270381.1
☐	Toxoplasma gondii isolate StaRosa114 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, part	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KX270380.1
☐	Toxoplasma gondii isolate StaRosa112 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, part	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KX270379.1
☐	Toxoplasma gondii isolate Juluapan110 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, par	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KX270378.1
☐	Toxoplasma gondii isolate Tecoman108 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, par	40.1	40.1	100%	0.29	100%	KX270377.1

4.

☐	Cryptosporidium parvum isolate GS 60-kDa glycoprotein (GP60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	KJ802723.1
☐	Cryptosporidium parvum isolate 443IIaA13G2R1 60 kDa glycoprotein (gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	KT716844.1
☐	Cryptosporidium sp. IIe clone 2570 60 kDa glycoprotein (gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	KM539057.1
☐	Cryptosporidium sp. IIc clone 451 60 kDa glycoprotein (gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	KM539051.1
☐	Cryptosporidium sp. IIc clone 345 60 kDa glycoprotein (gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	KM539049.1
☐	Cryptosporidium parvum gp60 gene for 60 kDa glycoprotein, partial cds, country: Japan: Hokkaido, Tokachi district	36.2	36.2	100%	3.7	100%	AB968045.1
☐	Cryptosporidium parvum isolate RH7 60 kDa glycoprotein (GP60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	KC469691.1
☐	Cryptosporidium parvum isolate RB22 60 kDa glycoprotein (GP60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	KC469688.1
☐	Eutrema salsugineum hypothetical protein (EUTSA_v10018320mg) mRNA, complete cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	XM_006390126.1
☐	Eutrema salsugineum hypothetical protein (EUTSA_v10018320mg) mRNA, complete cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	XM_006390125.1
☐	Cryptosporidium parvum isolate C6bARG 60 kDa glycoprotein (gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	KF289038.1
☐	Cryptosporidium parvum isolate PGIMER64 60 kDa glycoprotein (GP60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	KC813489.1
☐	Cryptosporidium parvum isolate PGIMER25 60 kDa glycoprotein (Gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	JF495159.1
☐	Cryptosporidium parvum isolate PGIMER5L 60 kDa glycoprotein (Gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	JF495153.1
☐	Cryptosporidium hominis isolate PGIMER4UU 60 kDa glycoprotein (Gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	JF495143.1
☐	Granulicella tundricola MP5ACTX9 plasmid pACIX902, complete sequence	36.2	36.2	100%	3.7	100%	CP002482.1
☐	Cryptosporidium parvum isolate Cp14 60 kilodalton glycoprotein (gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	GU214369.1
☐	Cryptosporidium parvum isolate Cp13 60 kilodalton glycoprotein (gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	GU214368.1
☐	Cryptosporidium parvum isolate Cp12 60 kilodalton glycoprotein (gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	GU214367.1
☐	Cryptosporidium parvum isolate Cp11 60 kilodalton glycoprotein (gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	GU214366.1
☐	Cryptosporidium parvum isolate Cp10 60 kilodalton glycoprotein (gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	GU214365.1
☐	Cryptosporidium parvum isolate Cp9 60 kilodalton glycoprotein (gp60) gene, partial cds	36.2	36.2	100%	3.7	100%	GU214364.1

Los autores:

Nombre Completo	Identificación N°
Laura Alejandra Osorio Delgado	1'110.556.265

Manifiesto (an) la voluntad de:

Autorizar [X]

No Autorizar [ ] **Motivo:** _____

La consulta en físico y la virtualización de **mi OBRA**, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado [X]

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

USO OFICIAL

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 ***"...Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable"*** y 37 ***"...Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro"***. El artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "***los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores***" y en su artículo 61 de la Constitución Política de Colombia.

- Identificación del documento:

Título completo:	**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Giardia duodenalis*, *Blastocystis* spp. *Toxoplasma gondii* y *Cryptosporidium* spp. EN FRUTAS Y HORTALIZAS COMERCIALIZADAS EN LA CIUDAD DE IBAGUÉ**
Trabajo de grado presentado para optar al título de:	**Biólogo**

Quienes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el día _20_ del mes _de febrero__ del año 2020.

Nombre Completo	Firma	Identificación N°.
Laura Alejandra Osorio Delgado		1'1110.556.265

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.

USO OFICIAL