

Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, Unidad Culiacán, A. C.

Presencia de Cryptosporidium y Giardia en Agua  
Superficial de Uso Agrícola, Tinas de Lavado,  
Espreas y Superficie de Tomate

Por:

Johana Marcela Soto Beltrán

TESIS APROBADA POR LA

UNIDAD CULIACÁN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE  
PRODUCTOS AGRICOLAS PARA ZONAS TROPICALES Y  
SUBTROPICALES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO

de Maestría

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Culiacán, Sinaloa

Agosto de 2004.

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permite y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD).

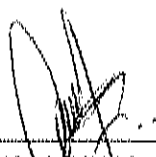
La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director o directora de la tesis.

---

Dr. Alfonso A. Gardea Bejar  
Director General.

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Johana Marcela Soto Beltrán, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.




Dr. Cristóbal Cháidez Quiroz  
Director de Tesis



Dr. José Benigno Valdez Torre  
Asesor



M.C. José Armando Carrillo Fasio  
Asesor



M.C. Pablo Gortáres Moroyoqui  
Asesor

*"La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable, pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio".*

*CIENCIA*

*Con mucho amor para:*

*Mis padres Juan José Soto Salazar y Rosa del Carmen Beltrán Gastelum, a quienes agradezco el haberme enseñado lo que soy, impulsarme por ser mujer de provecho, de grandes ilusiones y de noble corazón, a mis hermanas Yacenia Marlen Soto Beltrán y Mariela Soto Beltrán, a ustedes mi familia quienes son mi fuerza, alegría y constancia en la vida.*

*¡Gracias por todo su amor!*

Agradezco Sinceramente:

A Dios, Nuestro Señor, por permitirme vivir y no sólo existir, sino existir y crear, saber gozar y sufrir y no dormir sin soñar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

Al Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz, por haber depositado en mi su confianza y por dedicar parte de su tiempo en enseñarme que la preparación es la clave de la vida. Su gran experiencia y dedicación fueron parte indispensables para el logro obtenido. Muchas gracias!

Al Dr. José Benigno Valdez Torres por sus invaluable asesorías en el área de estadística.

Al M.C. Pablo Gortarez Moroyoqui por transmitirme sus conocimientos y por su gran apoyo para la realización de esta tesis.

Al M.C. Armando Carrillo Fasio por su importante colaboración.

A mis profesores de Maestría, Dr. Jorge H. Siller Cepeda, Dr. Tomás Osuna Enciso, Dr. Miguel Angel Angulo Escalante, Dr. Raymundo Garcia y la Dra. María Dolores Muy Rangel por transmitirme sus conocimientos.

Al I.Q. Werner Rubio Carrasco, I.B.Q. Evelia Araiza Lizarde, Q.F.B. Paola Meza Astorga y Q.F.B. Celida Isabel Martinez Rodriguez, MC. Rosabel Velez, MC. Yadira López Pantoja, quienes me apoyaron en todo momento y estuvieron pendientes de cada cosa necesaria para la realización de este proyecto.

A mis grandes amigos Hilda Horalia Álvarez Olivas, Gloria Elena Velásquez Valdez, María Elena Rocín, Dalia Magaña Ordorica, Nohelia Castro del Campo, Javier

López Pérez, Gabriel Cazárez Duarte, Lucio de Jesús Hernández Díaz, por su valiosas amistad y sobre todo por su ayuda incondicional para llevar a feliz termino esta grandiosa investigación. Valoro de todo corazón todo su apoyo. Muchas gracias AMIGOS, siempre estarán en mi corazón.

A Víctor Arana Alarcón por transmitirme su alegría en los momentos difíciles.  
Gracias, siempre lo recordare.

A mis compañeros de Maestría y todo el personal CIAD.

## CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo General.....	6
Objetivos Particulares.....	6
HIPÓTESIS.....	7
METAS.....	7
REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	9
Descripción del Problema.....	9
Importancia del Agua del Uso Agrícola.....	10
Mecanismo de Contaminación del Agua de Uso Agrícola.....	15
Microorganismos Patógenos Asociados con Frutas y Hortalizas.....	17
Desinfección en el Agua de Usos Agrícola.....	21
Turbidez.....	23
Generalidades de los Microorganismos en Estudio.....	25
<i>Cryptosporidium</i> spp.....	25
Taxonomía.....	25
Ciclo de vida.....	26
Patogenicidad.....	29



Enfermedad.....	29
Prevalencia y brotes.....	30
<i>Giardia</i> spp.....	31
Taxonomía.....	31
Ciclo de vida.....	32
Patogenicidad.....	34
Enfermedad.....	35
Prevalencia y brotes.....	35
Transporte de <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> en Agua.....	36
Métodos de Detección en el Ambiente.....	39
Técnicas de Concentración con Filtros de Polipropileno.....	40
Filtración.....	40
Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	41
Método Immunomagnético.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
Estudio Exploratorio.....	44
Selección de los Puntos de Muestreo.....	44
Toma de Muestra de Agua Superficial.....	46
Purificación de Protozoarios de la Muestra.....	47
Purificación por Flotación.....	48
Tinción.....	48
Microscopía.....	49
Reporte de Resultados.....	49
Selección de Empaques Agrícolas.....	50

Frutos Analizados.....	51
Estudio Experimental.....	51
Simulación de Tinajas de Lavado.....	52
Simulación de Espreas.....	53
Purificación de Protozoarios de la Muestra.....	53
Purificación por Flotación.....	54
Tinción.....	54
Microscopía.....	55
Reporte de Resultados.....	56
Eficiencia de Recuperación del Método de Inmunofluorescencia 1623.....	56
Análisis Estadístico.....	60
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
Resultados Estudio Exploratorio.....	62
Resultados Estudio Experimental.....	76
Análisis de Varianza Simulación Tinajas de Lavado.....	76
Efectos de Interacción.....	78
Efectos Principales.....	81
Análisis de Varianza Simulación Espreas.....	83
Efectos Principales.....	84
CONCLUSIONES.....	86
SUGERENCIA.....	88
LITERATURA CITADA.....	90
ANEXOS.....	105

## LISTA DE CUADROS

Cuadros	Página
1. Agentes Patógenos Transmitidos por el Agua.....	16
2. Resistencia de Microorganismos al Cloro con 99% de Inactivación.....	23
3. Número de Muestras Evaluadas en la Zona Central del Valle de Culiacán...	46
4. Concentración de <i>Giardia</i> y <i>Cryptosporidium</i> / 100 l de Muestra.....	66
5. Porcentaje de Muestras que Contienen Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> y Quistes de <i>Giardia</i> .....	71
6. Concentración y Promedio de Muestras Positivas para Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> y Quistes de <i>Giardia</i> .....	72
7. Tipos de Productos que Pueden ser Irrigados con el Agua Superficial Analizada.....	73
8. Concentración y Promedio de las Muestras Positivas para Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> y Quistes de <i>Giardia</i> , en Empaques Agrícolas del Valle de Culiacán.....	74
9. Concentración y Promedio de las Muestras Positivas para Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> y Quistes de <i>Giardia</i> en Empaques Agrícolas del Valle de Culiacán.....	75
10. Análisis de Varianza Simulación Tinajas de Lavado.....	77
11. Análisis de Varianza Simulación Espreas de Lavado.....	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Consumo de Agua por Sector en México.....	11
2. Mecanismo de Contaminación de Frutas y Hortalizas por Microorganismos Patógenos.....	18
3. Mecanismo de Infección por <i>Cryptosporidium</i> .....	28
4. Mecanismo de Infección por <i>Giardia</i> .....	33
5. Puntos Seleccionados del Valle de Culiacán.....	45
6. Efectos de Interacción Inóculo – Turbidez, Simulando Tinajas de Lavado...	79
7. Efectos Principales Simulación Tinajas de Lavado.....	82
8. Efectos Principales Simulación Espumas de Lavado.....	85

## RESUMEN

El agua superficial utilizada para el riego de los cultivos agrícolas puede contener diversos patógenos, los cuales representan un riesgo de contaminación para las frutas y hortalizas que están en contacto con el agua contaminada. La presencia de microorganismos patógenos sobre frutas y hortalizas frescas afecta su inocuidad, repercutiendo en problemas de salud humana, que se ve reflejado en una alta incidencial de brotes diarreicos y en ocasiones intoxicaciones con implicaciones clínicas, sobre todo en aquellas personas que tienen contacto directo con estos productos.

En los últimos diez años, *Cryptosporidium* y *Giardia* han adquirido gran importancia por ser patógenos transmitidos por el agua, ser resistentes a los productos comúnmente templados para la desinfección, requerir bajas dosis para inducir la infección; así como, poder sobrevivir por largos períodos de tiempo en agua superficial y superficie de productos agrícolas.

En México, pocos estudios se han llevado a cabo para determinar la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua superficial de uso agrícola y para el lavado de hortalizas frescas. Tampoco existe información que nos permita conocer la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en tinas de lavado de empaques agrícolas y su posible adherencia a la superficie de hortalizas.

El propósito del presente estudio fue cuantificar los ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en agua de riego del Valle de Culiacán, su presencia en empaques agrícolas que utilizan esta agua superficial para lavado y desinfección de hortalizas; así como, determinar la capacidad in vitro de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* de permanecer sobre la superficie de frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

Se utilizaron tres concentraciones de ooquistes (10,000, 1,000 y 100 ooquistes / L); dos concentraciones de cloro (100 y 300 ppm) y dos niveles de turbidez (2 y 100 NTU) simulando condiciones de empaques agrícolas, en tinas de lavado y espreas.

El estudio se realizó en las parcelas que utilizaron el agua superficial para lavado y desinfección de hortalizas; así como, del filtrado de los oocistos de *C. parvum* de polivalencia sobre la superficie de frutos de tomate (ver, verificación en el Anexo).

Se utilizaron tres concentraciones de oocistos (10,000, 1,000 y 100) (mquistes / L.); dos concentraciones de cloro (100 y 300 ppm) y dos niveles de turbidez (2 y 100 NTU) simulando condiciones de aguas agrícolas, en líneas de lavado y espreas.

Para llevar al cabo el estudio se utilizó el método de filtración por membrana de 1 µm, aprobado por la Agencia de Protección Ambiental de los EUA, el cual consistió en tomar muestras de 100 L de agua superficial, el través de un filtro de polipropileno de 1 µm de porosidad. El filtro fue lavado y lavado para desprender los oocistos y quisles adheridos a las fibras. El líquido de lavado fue centrifugado por centrifugación a 1,500 x g / 5 min, para posteriormente llevar a la centrifugación a 1,500 x g / 5 min y finalmente filtrar a través de una membrana de acetato de celulosa. La cuantificación de oocistos de *C. parvum* y quisles de *Giardia* se llevó a cabo por el método de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales.

Para los ensayos in vitro sobre la adherencia de oocistos de *C. parvum* y quisles de *Giardia* sobre la superficie de frutos de tomate, se simuló las condiciones de lavado y espreas. Cuando las condiciones fueron de rinas de lavado se utilizaron concentraciones de 4 L de agua (adicionada en los tratamientos se adicionaron concentraciones de turbidez y cloro (Hipoclorito de Sodio), posteriormente se aplicó el agua

En los oquistes de *Cladophora* y *Nitella*, se lavó el fruto de tomate y se dejó actuar por un tiempo de 2 minutos, posteriormente se dejó actuar el fruto durante 20 minutos. Para analizar el fruto se utilizó el método de inmunofluorescencia 1623 anteriormente descrito. La cuantificación de oquistes (fo) se reportó en oquistes adheridos / gramo de muestra analizada.

En los ensayos in vitro de esporas se utilizaron atomizadores manuales, se inundó el agua con oquistes de *Cladophora* y *Nitella* y se simuló con nebulizadores conocidos de cloro, u. s. c. Se asperjaron los tomates por un tiempo de 30 segundos y se dejó actuar por 20 minutos, posteriormente se analizarlos por el método de inmunofluorescencia 1623. Los datos se reportó en oquistes adheridos / gramos de muestra analizada.

Se detectaron oquistes superficiales de uso agrícola (oquistes de *Cladophora*) en 28/58 (48.3%) y oquistes de *Ciardia* en 29/58 (50%) de las muestras analizadas. Se encontró la presencia de protozoos en el 98.2% de las muestras analizadas y solo el 36.2% de las muestras fueron positivas para protozoos.

En los paquetes agrícolas, en los cuales utilizan el agua superficial para el lavado de frutas y hortalizas, se detectaron varios protozoos: *Cladophora* y *Ciardia* estuvieron presentes en un rango de 133.33 oquistes y 116.71 --600.60 oquistes/ 100 L, respectivamente.

Asimismo se detectó la presencia de oquistes de *Cladophora* y *Ciardia* en el tomate durante el proceso de recepción en el momento de lavado, en un rango de

5,000 ooquiste / g de fruto, mientras que durante el proceso de inspección, solo se detectó la presencia de oocistos de *C. parvum* en un rango de 6006.06 oocistos / g de fruto.

Cuando se simularon condiciones in vitro de tinajas, k lavado, los resultados indicaron que a las concentraciones de inóculo y menor turbidez, se presentó mayor probabilidad de que los oocistos de *C. parvum* que, den adheridos en la superficie del fruto, en un rango de 77.20 - 952.38 oocistos / g de muestras, mientras que al simular altos niveles de turbidez, la probabilidad de adherencia fue menor, de 0.0111 (SC) en un rango de 0.16 oocistos / g de muestras, las concentraciones de oro utilizadas no resultaron significativas para la adherencia de los oocistos al fruto.

Durante la simulación de inspección de campo, se encontró que a mayor concentración de inóculo, mayor probabilidad de que los oocistos de *C. parvum* que, den adheridos en la superficie del fruto, en un rango de 27776 - 625 oocistos / g de muestras. Sin embargo, la concentración de 100 oocistos / L, no tuvo adherencia al fruto.

Los resultados indican que, *C. parvum* y *C. parvum* están presentes en la superficie del uso agrícola de Culindón, en las tinajas k lavado de empaques agrícolas y que ambos parásitos se detectaron en los frutos de las tinajas de lavado y de inspección.

La presencia de ambos parásitos, en la superficie, k lavado, inspección y superficie de frutos es mayor que la reportada en el presente estudio, debido a la baja sensibilidad del método empleado. La pérdida de oocistos de *C. parvum* y



quistos de (iordio dtmnte el pn)c(1samcn10 de las llll<1stms fu,, allu, por i) q, rn la colmenInlción de ooquiSl.(ls y quist:c,s 0111:0111rudos en las n11.leslnis puedtin ser 111ud10 mayor,

Las ctnce,11\trH,ionul,s que se observaron en algunas lfo las nweslrns Mialiwdns repres,111tan un vcrdndoro riesgo a la sillud d d co,,lsumidor, si se asocian a productos q, rn son reg,idos y lawdos cOII esm ugua, debido a que ooquislc y quisl(1S puedml pt1rnume,cer viables en el llgull s11prkial, usi como m la :wperlkii: de horl.u.lil,ls, ocl.lsiol1t111,lo un riesgo de inli:icció, pues C1:n110.1poridiu111 y (Jiardia requi111\ll bajas do:ds info,;ciosa para cnusur la infocdón. Se ha estimado ,ul1 la do,;is infoc,;iosa pum (:,,n.110.1poridi111n es de IO(Hlquistt:s, mientrn quil p,1,m Gi,mllá (fú 11\ctsurio de J. J00 quistt1s.

El nu\todo cmlendo en c,m estudio no detmminó la viabilidad m las mu,1st1:11s de agua, pero investigaciones prnvias sugieren que estos protozoarios son capuce de S(lbrevivir durume largos periodos jfo tiempo en condic.iones usociad,ts con d agua de hlvjldo y superficie de produ::los.

Por lo lanto, el mejor método jllnl eliminar ambos prntowarios de los pnductos fresc,Js ,:s prevenir ln contnmilm.ción, ant,ls ,fo que 6slll si lleve a cribo. Por ello es 11ecesnrío alorttir a lus ,lutorid1Hks, pom que se r<>,1,icc 1111111011itoreo colHinuo sobre 111 presencia di: (1,11pl,11j1, >ndillmy (Hardia en agua de riego y el agua ulilizad11 durante d lavado y desinfo:icció, de f'ut,;is y hortaints,

## INTRODUCCIÓN

La calidad microbiológica del agua utilizada para irrigar los cultivos agrícolas es de vital importancia, ya que con ello se puede asegurar que frutas y hortalizas frescas, estén libres de patógenos (FDA, 1998). La principal fuente de contaminación proviene de heces fecales de animales y del hombre, así como de aguas residuales tratadas y no tratadas (Thurston-Enriquez *et al.*, 2002), que son vertidas en ríos y canales, que son utilizados principalmente para el riego de cultivos agrícolas (Craun y Castro, 1996) y en ocasiones para el lavado y desinfección de hortalizas (Kniel *et al.*, 2002).

Las frutas y hortalizas frescas pueden contaminarse con microorganismos patógenos durante el cultivo, cosecha, procesamiento y distribución (Beuchat, 1996). Los principales microorganismos que se pueden encontrar en frutas y hortalizas incluyen, *Escherichia coli* patogénica, *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp., así como *Cyclospora cayentanensis*, Norovirus, virus de hepatitis A, *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* (Díaz-Sobac y Veron-Carter, 1999).

El agua superficial es utilizada en los cultivos agrícolas y en menor frecuencia para el lavado y desinfección de frutas y hortalizas. En el mundo la mayoría de las áreas agrícolas utilizan el agua superficial en el campo o en los empaques. En México, el 42% del agua de uso agrícola es tomada de varias fuentes de agua superficial (CNA, 2003).

El riesgo de contaminación se incrementa cuando el agua utilizada para irrigar los campos agrícolas esta contaminada, ya que puede contribuir a que algunos patógenos, se encuentren sobre la superficie de los productos frescos (Cifuentes *et al.*,

2000). Varios brotes de *Cyclospora cayentanensis* en Norte América, se asocian al consumo de frambuesas contaminadas, las cuales fueron irrigadas con agua contaminada.

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2000), reporta que cada año ocurren cuatro mil millones de casos de diarrea, esto comúnmente inducido por infecciones gastrointestinales, provocando la muerte de alrededor de 2.2 millones de personas anualmente.

En los últimos diez años, *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* han adquirido importancia, por ser parásitos transmitidos por el agua (Rose *et al.*, 1991). En condiciones adversas, ambos parásitos producen una estructura llamada ooquiste (4-6µm) y quiste (7-11µm) de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp., respectivamente (Walker y Stedinger, 1999), que son liberadas por personas infectadas y son capaces de sobrevivir al medio ambiente; así como, a los productos químicos y/o naturales comúnmente empleados en la desinfección (Rose *et al.*, 1991; Medema *et al.*, 1998).

Estas estructuras, si se adhieren a la superficie de hortalizas, pueden resistir tratamientos de desinfección comúnmente empleados en empaques agrícolas (150-300 ppm de cloro total y con un tiempo de contacto de 2 minutos), debido a las características de los patógenos y la interferencia de la materia orgánica presente en las tinas de lavado (Chaidez *et al.*, 2003).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* pueden estar presentes en agua de riego y adherirse a hortalizas que son regadas y/o lavadas con esta agua contaminada. Debido a que estos protozoarios están presentes en el agua superficial,

pueden adherirse a la superficie del producto durante la cosecha o bien durante los proceso de lavado en los empaques. Monge *et al.* (1996), realizaron un estudio en el cual la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en frutas y hortalizas pudo deberse al uso de agua de irrigación contaminada, además reportan la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en hojas y raíces de cilantro. Sánchez (2002), menciona que cuando hortalizas tales como: zanahoria, rábano, lechuga, cilantro y tomate, son regadas con agua contaminada que contenga heces, éstas presentan un alto riesgo de que *Cryptosporidium parvum* se queden adheridos a su superficie.

Debido a las bajas dosis que son requeridas para causar la infección (Thurston-Enriquez *et al.*, 2002) el riesgo se incrementa al consumir hortalizas frescas que son irrigadas y/o lavadas con agua contaminada con heces fecales. Para *Cryptosporidium* 10 ooquistes son suficientes para provocar la infección, mientras que para *Giardia* basta el consumo de 10-100 quistes (Bitton, 1994).

La concentración de ooquistes y quistes en el agua puede aumentar en lugares donde se descargan agua residuales (Ong *et al.*, 1996). Altas concentraciones de ambos protozoarios se pueden detectar en heces de becerros jóvenes, estimando una descarga de  $2.6 \times 10^{10}$  ooquistes / kg de heces. Animales asintomáticos pueden liberar concentraciones de más de  $10^4$  ooquistes / g de heces (Bradford y Schijven, 2002; Cacciò *et al.*, 2003).

La contaminación del agua utilizada para regar los cultivos agrícolas y para el lavado de hortalizas frescas con protozoarios representa un riesgo a la salud, es por ello necesario establecer puntos de control, que determinen la calidad microbiológica del

agua de riego y de lavado de productos frescos. Actualmente no existen normas que determinen la evaluación de protozoarios en agua de uso agrícola.

Hasta hoy, las normas para virus y protozoarios no han sido propuestas; sin embargo, ningún virus o protozoarios deben ser detectados en el agua (Roubin *et al.*, 2002). Los sistemas de tratamiento de agua, por tanto, deben proveer una filtración y desinfección adecuada, que aseguren una calidad aceptable. Las guías sobre la calidad del agua, establecidas por Canadá establecen, que la verdadera razón para que no existan normas para protozoarios y específicamente para *Cryptosporidium* y *Giardia*, es debido a dificultades técnicas, altos costos en recuperación y a que no se determina su viabilidad; sin embargo, el Comité de Salud Ambiental en Canadá, esta reconsiderando su presencia en el agua y por ello su análisis esta en revisión. Solamente en el Reino Unido, el monitoreo de *Cryptosporidium* es requerido por ley, de acuerdo a la Organización de Estándares Internacionales (Roubin *et al.*, 2002).

Existen diversos métodos utilizados para la detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua, pero son complicados y en algunos casos los resultados pueden ser difíciles de interpretar, debido a la baja capacidad de recuperación, la poca habilidad para identificar la especie y su viabilidad (Rose *et al.*, 1989). Actualmente, las muestras ambientales son identificadas por métodos de inmunofluorescencia después de concentrarlas por métodos de colección de información (ICR) 1622/1623 (DiGiorgio *et al.*, 2002). Esta técnica provee un indicador cuantitativo de los niveles de contaminación de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua (EPA, 1995).

En México pocos estudios se han llevado a cabo para detectar concentraciones de ooquistes y quistes en agua superficial de uso agrícola y su presencia en la superficie de los frutos. Debido a lo anterior se planteó el presente estudio con la finalidad de evaluar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*, en agua de riego, tinas de lavado y espreas; además, de evaluar la presencia de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en la superficie de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) durante el proceso de desinfección del fruto.

## OBJETIVO

### Objetivo General

Determinar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en agua de superficial que se utiliza para el riego, lavado y desinfección de hortalizas, así como de evaluar la capacidad *in vitro* de *Cryptosporidium parvum* de adherirse a la superficie de frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

### Objetivos Particulares

1. Cuantificar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en agua superficial de uso agrícola del Valle de Culiacán.
2. Evaluar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en el agua utilizada para el lavado de frutas y hortalizas en los empaques agrícolas del Valle de Culiacán.
3. Evaluar *in vitro* la capacidad de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* de adherirse a la superficie de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a tres concentraciones de *Cryptosporidium parvum* (100, 1,000 y 10,000 ooquistes/L), dos concentraciones de cloro (100 y 300 ppm) y dos niveles de turbidez (2 y 100 NTU), simulando condiciones de tina de lavado de empaques agrícolas.

4. Evaluar *in vitro* la capacidad de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* de adherirse a la superficie de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a tres concentraciones de *Cryptosporidium parvum* (100, 1,000 y 10,000 ooquistes/L), dos concentraciones de cloro (100 y 300 ppm) y dos niveles de turbidez (2 y 100 NTU), simulando condiciones de espreas de empaques agrícolas.

#### HIPÓTESIS

1. El agua superficial de uso agrícola del valle de Culiacán, presenta ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*.
2. Los ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* se encuentran presentes en agua de lavado utilizada por los empaques agrícolas del valle de Culiacán.
3. La adherencia *in vitro* de ooquiste de *Cryptosporidium parvum* a la superficie de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), se ve afectada por la turbidez.

#### METAS

1. Obtener información relacionada con la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en el agua de uso agrícola y de lavado de empaques agrícolas del valle de Culiacán.



2. Dar a conocer que existe un verdadero riesgo de encontrar ooquistes de *Cryptosporidium* en el agua de riego y en la superficie de hortalizas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Descripción del Problema

En México, la información relacionada sobre la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua superficial de uso agrícola es mínima, tampoco existe información que nos permita conocer la presencia de estos protozoarios en empaques agrícolas y su posible adherencia a la superficie de frutas y hortalizas. Poco se ha reportado sobre la incidencia de protozoarios en fuentes de agua superficial.

El agua utilizada durante el riego y lavado de los productos agrícolas, puede ser un motivo de preocupación debido a que representa una fuente de contaminación y sirve como vehículo para diseminar la contaminación de microorganismos patógenos de un producto a otro durante el riego o lavado.

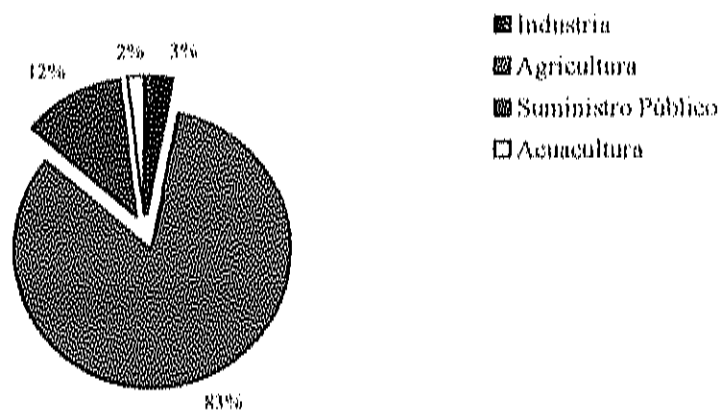
*Cryptosporidium* y *Giardia* son protozoarios que pueden estar presentes en el agua de riego y quedar adheridos en la superficie de productos hortícolas que son regadas y/o lavadas con agua contaminada por estos microorganismos, ocasionando problemas de salud pública en personas que están en contacto directo con estos productos frescos. Es por ello la importancia de poder detectarlos en agua superficial de uso agrícola, así como en tinajas de lavado utilizadas en los empaques agrícolas para el lavado y desinfección de los productos hortícolas.

### Importancia del Agua de Uso Agrícola

La disponibilidad de agua es uno de los grandes problemas que se plantean hoy en el mundo. Durante los próximos 50 años, los problemas relacionados con la falta de agua o la contaminación de masas de agua afectará prácticamente a todos los habitantes del mundo (OMM, 1997).

El planeta cuenta con 1.35 millones de kilómetros cúbicos de agua, de los cuales el 97.5 % está en el océano y el 2.5 % restante es agua dulce presente en la tierra y en la atmósfera. De esta pequeña cantidad 2.24 % se encuentra en los glaciares y en los polos del planeta y el 0.26 % restante es agua dulce accesible para el consumo humano (OMM, 1997). Las zonas áridas y semiáridas, donde se encuentra más de la mitad de los suelos aptos para la agricultura, disponen de menos del 10 % del total del país (INEGI, 2004).

En México el agua superficial se utiliza en su mayor parte para generar electricidad ( $113 \text{ km}^3$ ) en plantas termo e hidroeléctricas. Puesto que esta agua vuelve a su cauce se le puede dar otro uso, se considera que no se consume. El volumen total consumido tanto de aguas superficiales como subterráneas asciende a  $73 \text{ km}^3$ , de los cuales el mayor porcentaje le corresponde al sector agrícola con  $61 \text{ km}^3$  (83%), y después al uso doméstico amplio con  $8.5$  (12%). La industria utiliza  $2.5 \text{ km}^3$  (3%), y en acuicultura intensiva y otros se invierten  $1.4 \text{ km}^3$  (2%) (Fig. 1) (CEPIS, 1998).



Fuente CIEPIS, 1998.

**Figura 1.** Consumo de Agua por Sector en México.

El agua es un vehículo importante para la transmisión de patógenos entéricos en humanos (Fernandez *et al.*, 1989). El mantener la calidad microbiológica del agua se ha usado como un medio importante en la prevención de enfermedades originadas por el agua durante el siglo XX (Vásquez-Arroyo y Cabral-Martell, 2001).

El uso del agua en la agricultura es de gran importancia, sobre todo por los grandes volúmenes que son requeridos. El agua de riego ha jugado y seguirá siendo importante para la producción de cosechas.

Entre las fuentes más comunes del agua de uso agrícola se encuentra el agua de superficie procedente de los ríos, arroyos, canales, embalses (como represas, lagos) y pozos, así como fuentes municipales (FDA, 1998).

Tradicionalmente las aguas residuales generadas por las comunidades son vertidas a cuerpos receptores, y si bien las aguas residuales son ricas en nutrientes, es preciso señalar que también están cargadas de impurezas que alteran física, química y biológicamente su calidad y son fuente principal de microorganismo patógenos (Okafo *et al.*, 2003). La presencia de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en aguas residuales tratadas y no tratadas ha sido reportado, encontrando más del 80% de las muestras de agua residual tratadas positivas para *Cryptosporidium* spp. en un rango de concentración de 0 a 10,252 ooquistes / 40 L. Sin embargo, *Giardia* spp. se detectó en el 100% de las muestras de agua residual no tratadas con una media geométrica de  $3.9 \times 10^3$  quistes / 100 L, mientras que *Cryptosporidium* spp. se detectó en el 67% de las muestras con una media geométrica de  $3.7 \times 10^2$  ooquistes / 100 L. (Nasser *et al.*, 2003).

En México la re-utilización de las aguas residuales en agricultura, es una costumbre y las infecciones intestinales en este país son una de las principales causas de morbilidad y la catorceava causa de mortalidad. Al menos una parte de estas infecciones tiene su origen en el reuso de esas aguas (Ibáñez, 2002).

En los países en desarrollo las enfermedades diarreicas representan uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones que inciden en el ámbito económico, social y político (Vásquez-Arroyo y Cabral-Martell 2001).

Las infecciones y enfermedades parasitarias son aún las causas principales de enfermedad y muerte en el mundo, principalmente por la pobre calidad del agua y las diarreas, las cuales en 1997 se ubicaron en el primer lugar por causas de morbilidad y el sexto por causa de mortalidad (Vásquez-Arroyo y Cabral-Martell 2001).

La alta demanda de agua para las actividades de crecimiento y desarrollo social, determinan que la calidad de las fuentes presentan un deterioro que va en aumento, y que las aguas subterráneas estén siendo contaminadas y consumidas a una velocidad mayor a la de recarga natural (Ibáñez, 2002). Sin embargo, el agua subterránea se puede ver afectada por el agua superficial; asimismo, la de pozos viejos con grietas en su revestimiento, también puede estar expuesta a contaminación. En un estudio realizado por Nasser *et al.* (2003), comprobaron que los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. fueron retenidos en los suelos arenosos y presentaban alta probabilidad de atravesar el suelo y dirigirse hacia aguas subterráneas. Entre las medidas para asegurar la debida calidad del agua, una es comprobar que los pozos estén debidamente construidos y protegidos, tratar el agua para reducir la cantidad de contaminante y usar diferentes métodos de aplicación del agua para restringir su contacto con las hortalizas (FDA, 1998).

Cuando la calidad del agua de irrigación es baja, puede constituir una fuente de riesgo y un medio para diseminar la contaminación en el campo. Cuando el agua entra en contacto con hortalizas, la posibilidad de contaminación de estos productos por microorganismos patógenos depende de la calidad de la misma, y si los microorganismos que sobreviven en dichos alimentos, pueden causar enfermedades (FDA, 1998).

El tratamiento de las aguas superficiales es inevitable. Los procesos de tratamientos deben proporcionar como mínimo una reducción de seis logaritmos de bacterias, cuatro logaritmos para virus, y tres logaritmos para quistes de protozoarios (Bitton, 1994).

Todas las aguas superficiales, requieren filtración y un pre-tratamiento apropiado. Las barreras múltiples de protección son importantes para las fuentes de agua subterráneas. Aunque el suelo es la principal barrera de protección de la calidad del agua subterránea, no todos los acuíferos están protegidos de tal manera que los contaminantes microbianos pueden penetrar. Se debe mantener una vigilancia constante para detectar cualquier cambio alrededor de la fuente que pueda repercutir negativamente en las barreras de protección, contra el drenaje del agua superficial y la filtración lateral de las aguas residuales en los pozos o manantiales (Craun y Castro, 1996).

Para proteger al recurso hídrico, el medio ambiente y a la salud pública, en materia de generación, tratamiento, disposición y uso seguro de las aguas residuales, existen las normas oficiales mexicanas NOM-001-SEMARNAT-96, NOM-002-SEMARNAT-96 y NOM-003-SEMARNAT -97, las cuales señalan los límites máximos permisibles de contaminantes químicos y biológicos. En estas normas se recomienda que el agua residual para riego de frutas y hortalizas deba contener menos de 1000 coliformes fecales por 100 mL de agua y menos de un huevo de helminto por litro de agua. Sin embargo, no existen valores de normas que nos permita determinar la presencia de protozoarios, específicamente de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua de uso agrícola.

El grupo de coliformes se emplea como indicador de contaminación porque algunos miembros del grupo están presentes en la flora intestinal normal de los seres humanos y otros animales de sangre caliente y se eliminan en gran número en los

desechos fecales. La presencia de coliformes fecales en el agua potable, indica la posible presencia de agentes patógenos transmitidos por el agua (Craun y Castro, 1996).

La ausencia de coliformes en un sistema público de abastecimiento de agua se interpreta como agua inocua libre de agentes patógenos y con bajo riesgo de enfermedades infecciosas diseminadas por el agua. Aunque la presencia de coliformes puede indicar la posibilidad de contaminación fecal, la ausencia de coliformes, especialmente en los sistemas de agua que son desinfectados, no excluyen la presencia de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*, los cuales son más resistentes a los desinfectantes que los microorganismos coliformes (Craun y Castro, 1996).

Así mismo, durante las operaciones en campo y empaque se deben seguir ciertos lineamientos, normas y controles que aseguren un programa preventivo de contaminación por microorganismos patógenos en el agua utilizada para lavado y desinfección de frutas y hortalizas. Estos lineamientos pueden ser divididos en buenas prácticas agrícolas (BPA) y buenas prácticas de manufactura (BPM) (Siller *et al.*, 2002).

#### Mecanismos de Contaminación del Agua de Uso Agrícola

El agua de uso agrícola puede contaminarse directa o indirectamente con materia fecal, procedentes de los seres humanos y de animales de sangre caliente que llegan al agua y de esta manera, incrementan la presencia y concentración de patógenos (Thurston-Enriquez *et al.*, 2002). En el Cuadro 1 se muestran los principales patógenos transmitidos por el agua.



**Cuadro 1.** Agentes Patógenos Transmitidos por el Agua.

<b>Agente Patógeno</b>	<b>Identificados</b>	
	<b>Históricamente</b>	<b>Recientemente</b>
<b>Bacterias</b>	<i>Shigella</i> spp.	<i>E. coli enterotoxigena</i>
	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli enterohemorrágica</i>
	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
	<i>Vibrio cholerae</i>	
<b>Protozoarios</b>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cyclospora</i>
<b>Virus</b>	<i>Hepatitis A</i>	Norovirus
		<i>Rotavirus</i>

Fuente: Craun y Castro, 1996.

La contaminación por materia fecal humana puede ocurrir debido a daños o deficiencias en los diseños de sistemas sépticos y descargas procedentes de tratamientos de aguas residuales (FDA, 1998). En la región agrícola del estado de Sinaloa (campo agrícola, drenes, canales y ríos), el fecalismo al aire libre es todavía una práctica común y sin duda uno de los principales factores por los cuales se contaminan los cuerpos de agua (Candil *et al.*, 1990).

La contaminación por materia fecal procedente de animales, son principalmente animales que pastorean en áreas de cultivo, el almacenamiento de estiércol, acceso no restringido del ganado a las aguas superficiales como pozos o zonas de bombeo y la existencia de altas concentraciones de fauna silvestre los cuales son reservorios de ooquiste y quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia* (Bednarska *et al.*, 1998).

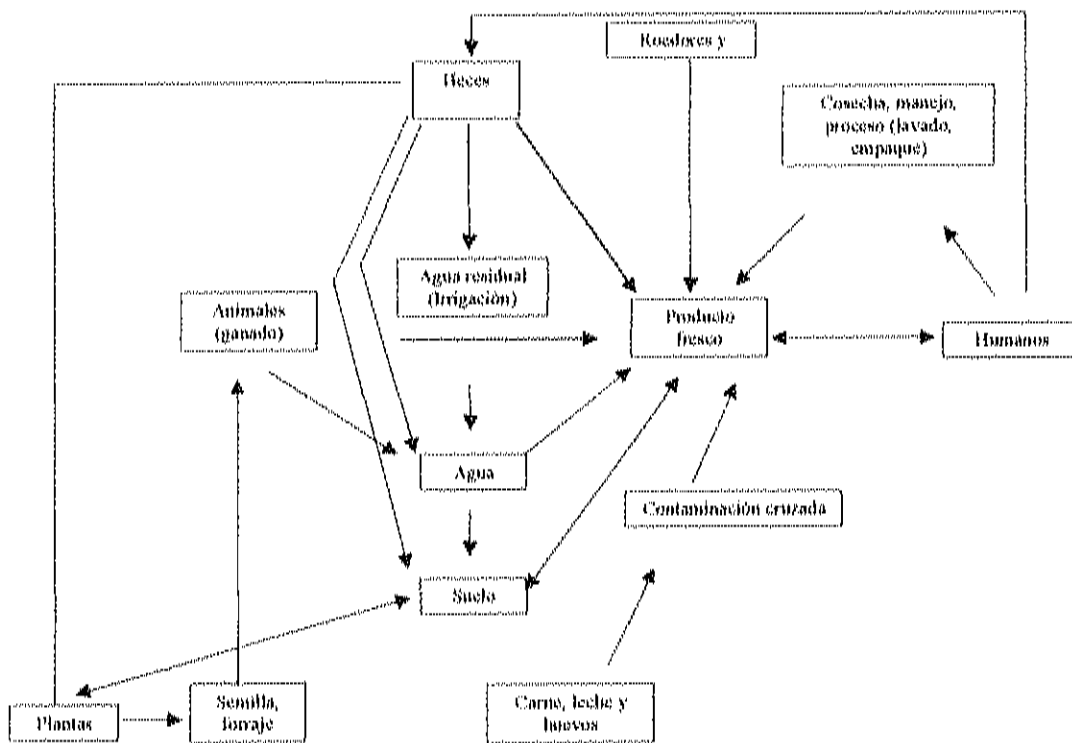
Las lluvias, son otro factor que contribuye a la contaminación de los suministros de agua, debido a que arrastran consigo materia fecal humana; así como de animales domésticos y silvestres, hacia aguas de ríos y de canales, que son utilizados para el riego de cultivos agrícolas (Thurston-Enriquez *et al.*, 2002).

La contaminación fecal de los abastecimientos de agua, es un factor que aumenta la probabilidad de transmisión de numerosas enfermedades infecciosas. La República Mexicana es una de las naciones que registran las tasas de mortalidad más elevadas por estos padecimientos a nivel mundial, siendo muy elevado el costo tanto en vidas humanas y recursos médicos destinados a la atención de los enfermos, como en pérdidas de tiempo laborable, ya que constituyen una de las primeras causas de ausentismos laboral (Candil *et al.*, 1990).

#### Microorganismos Patógenos Asociados con Frutas y Hortalizas

La presencia de microorganismos patógenos: bacterias, virus y protozoarios en productos frescos, han sido ampliamente documentada (Beuchat, 1996; Monge *et al.*,

1996; Chaidez, 2002). En la Figura 2 se aprecia el mecanismo de contaminación de Frutas y Hortalizas por microorganismos patógenos.



Fuente: Beuchat, 1996.

**Figura 2.** Mecanismo de Contaminación de Frutas y Hortalizas por Microorganismos Patógenos.

Investigaciones se han llevado a cabo para determinar la presencia de patógenos en frutas y hortalizas. Dentro de estos estudios se ha demostrado la presencia de

bacterias en la superficie de frutas y hortalizas, como es el caso de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *E. coli* enteropatógena, entre otras (FDA, 1998).

Los microorganismos patógenos que contiene el agua utilizada para el riego, así como para el lavado y desinfección de frutas y hortalizas, pueden infiltrarse en el producto a través de sus espacios intracelulares, a través de los poros, de los tejidos, de sus cutícula, lenticelas, entre otras (Harris *et al.*, 2003).

En los últimos años, *Escherichia coli* O157:H7 ha sido aislada frecuentemente de productos frescos como manzanas, melón y hojas de lechuga. Su transmisión se debió principalmente al uso de suelo y agua de riego contaminada (Solomon *et al.*, 2002).

Algunos brotes de salmonelosis han sido asociados al consumo de melones, como el reportado en 1991 en Michigan, en el cual, los melones se pudieron contaminar en el campo o durante el lavado en el empaque. Se asumió que *Salmonella* spp. estuvo presente en la corteza del melón (Harris *et al.*, 2003).

Sin embargo, las investigaciones relacionadas con la presencia de protozoarios y virus en frutas y hortalizas son pocos, debido a la falta de métodos sensibles capaces de detectarlos

Dentro de los parásitos que pueden estar presentes en frutas y hortalizas frescas, se encuentra *Ascaris lumbricoides*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayetanensis*, entre otras, cuyo principal vehículo de contaminación es el agua utilizada para regar los productos frescos (Brackett, 1987).

*Cyclospora cayetanensis* puede transmitirse por la ingesta de agua o comida contaminada con los ooquistes. Se han presentado algunos brotes relacionados con agua

residual (Sturbaum *et al.*, 1998). Así mismo, varios brotes de *Cyclospora cayentanensis* en Norte América, se asocian al consumo de frambuesas contaminadas (Pratdesaba *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2003).

Diversos estudios han demostrado que los ooquistes de *Cryptosporidium* y los quistes de *Giardia* son patógenos que pueden estar en contacto con los cultivos porque se encuentran en aguas que son utilizadas para la irrigación (Monge *et al.*, 1996; Thurston-Enriquez *et al.*, 2002).

Los quistes de *Giardia* han sido aislados de lechuga romana, así como quistes viables se han encontrado en fresas (Rose y Slifko, 1999). Monge *et al.* (1996), analizaron frutas y hortalizas en Costa Rica encontrando contaminación con ooquistes de *Cryptosporidium* en 1 a 8 % de las muestras analizadas.

Otros parásitos relacionados al consumo de frutas y hortalizas contaminadas, son los ooquistes de *Toxoplasma gondii*, los cuales tienen la capacidad de permanecer viables en el agua de riego y el suelo por muchos años. Al ingerir productos frescos sin lavar aumenta el riesgo de contaminación, debido a que el agua superficial utilizada para regarlos, puede contener estos ooquistes (Kniel *et al.*, 2002).

Los agentes diseminados por el agua seguirán en aumento cada día, a medida que se encuentren nuevas tecnologías para detectar los microorganismos que causan gastroenteritis u otras enfermedades humanas. Quizás nuevas investigaciones continúen descubriendo otros agentes patógenos diseminados por las aguas recién conocidos y emergentes.

### Desinfección en el Agua de Uso Agrícola

La desinfección es la destrucción de microorganismos capaces de causar enfermedades (Bitton, 1994). La inactivación de agentes patógenos microbianos a través del uso de desinfectantes es esencial para la protección de la salud pública (Craun y Castro, 1996).

Desinfectar frutas y hortalizas significa eliminar cualquier contaminante que se encuentre en la superficie del producto y la desinfección debe ser tal que no debe alterar la calidad del producto o su seguridad para el consumidor (FDA, 1998). Lavar las frutas y hortalizas con agua, es efectivo para remover tierra, sal y otros contaminantes; sin embargo, puede que no sea muy efectivo para quitar todos los microorganismos presentes (Beuchat, 1996); Además, es importante señalar la baja eficiencia en los sistemas de desinfección utilizados para el control de microorganismos en la recepción y lavado de frutas y hortalizas, así como las condiciones sanitarias del área de empaques (Siller *et al.*, 2002). La efectividad de los agentes antimicrobianos depende de su estado químico y físico, las condiciones de tratamiento (temperatura del agua, nivel de acidez, pH y el periodo de contacto), la resistencia de los microorganismos patógenos y la naturaleza de la superficie de las frutas y hortalizas (FDA, 1998).

Existen diversos métodos para lavar diferentes tipos de frutas y hortalizas, como son la inmersión total y la aspersion, o una combinación de ambos. Los tratamientos de lavado por aspersion quizás representen menor riesgo de propagación directa de contaminantes microbianos. Sea cual sea el método de lavado que se use, se recomienda

adoptar buenas prácticas agrícolas para mantener niveles apropiados de calidad en el agua (FDA, 1998).

Dentro de los desinfectantes mas utilizados se encuentra el cloro con una concentración entre 50 y 200 ppm y un pH de 6.0 a 7.5 para el tratamiento de frutas y hortalizas frescas después de la cosecha, siendo el periodo de contacto entre 1 y 2 minutos (FDA, 1998).

Los efectos de la desinfección sobre los ooquistes de *Cryptosporidium* y los quistes de *Giardia* han sido estudiados por diversos investigadores, como Finch *et al.* (1993), Chauret *et al.* (2001), Weir *et al.* (2002), Campbell y Wallis (2002), Linden *et al.* (2002), y otros, comprobando la diversa efectividad de los desinfectantes típicos empleados en el tratamiento, cloro, cloraminas, dióxido de cloro y ozono. La viabilidad de los ooquistes y quistes, se determinó infectando ratones con quistes tratados previamente con cada uno de los desinfectantes (Liyanage *et al.*, 1997).

En el Cuadro 2 se muestra diversos valores de CT (Concentración de cloro por tiempo de contacto) que son necesarios para inactivar en un 99 % a los diversos microorganismos. La resistencia de los microorganismos aumenta en el orden siguiente: priones, coccidios, esporas, mycobacterias, quistes, virus pequeños sin envoltura, trofozoitos, bacterias Gram-negativas, hongos, virus largos sin envoltura, bacterias Gram-positivas (Bitton, 1994; McDonnell y Russell, 1999; Tortora *et al.*, 2001).

**Cuadro 2.** Resistencia de Microorganismos al Cloro con 99% de Inactivación.

Microorganismos	Temperatura(°C)	pH	Cloro (mg/L)	Valores CT*
<b>E. Coli</b>	5	6.5	0.02-0.10	0.02
	23	7.0	0.1	0.014
<b>Poliovirus</b>	20	6.0	0.3-0.7	0.5-0.7
<b>Giardia Lamblia</b>	5	7.0	2.0-8.0	25.5-44.8
	25	7.0	1.5	<15
<b>Cryptosporidium parvum</b>	25	7.0	80	7,200

\* CT = Concentración de cloro (mg/L) multiplicada por tiempo de contacto (minutos).

Fuente: Craun y Castro, 1996.

### Turbidez

La turbidez es la propiedad óptica que ocasiona que la luz sea dispersada y absorbida en lugar de ser transmitida sin ningún cambio en la dirección de luz a través de la muestra (APHA, 1998). La turbidez es determinada con un espectrofotómetro o colorímetro y se expresa en unidades de absorbancia (Bitton, 1994), como Unidades Nefelométricas (UNT). En el espectrofotómetro un haz de luz es transmitido a través de



la suspensión de bacterias hacia un detector de luz sensible. A medida que el número se incrementa, menos luz llega al detector. Estos cambios de luz son registrados en una escala de porcentaje de transmisión, en algunas ocasiones se expresa en escala logarítmica y es conocida como densidad óptica (Tortora *et al.*, 2001).

La desinfección es afectada por diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos nitrogenados, hierro, manganeso y sulfuro de hidrogeno; los compuestos orgánicos disueltos tiene efecto en la demanda de cloro, cuya presencia reducen la eficiencia en el proceso de desinfección. Dentro de estos factores se encuentra la turbidez, la cual esta compuesta por materia orgánica e inorgánica y puede reducir la desinfección (Bitton, 1994).

La recuperación y desinfección de ooquistes y quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia*, respectivamente, se pueden ver afectados por la turbidez presente en las fuentes de agua. Debido a que es posible que los oo(quistes) se adhieran a las partículas suspendidas, ya que presentan un mayor tamaño que los oo(quistes) (diámetro de 4 - 6  $\mu\text{m}$  y 7 - 9  $\mu\text{m}$ ) (Dai y Boll, 2003). Además, los ooquistes de *Cryptosporidium* y los quistes de *Giardia* son resistentes a altas concentraciones de cloro, y según lo reportado por Medema *et al.* (1998), al unirse los ooquistes y la materia orgánica puedan sedimentar más rápidamente y disminuir así su recuperación. Un estudio realizado por Feng *et al.* (2003), indicaron que la recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium* en agua de diferentes turbideces, se ve afectado por el tamaño y concentración de partículas.

## Generalidades de los Microorganismos en Estudio

### ***Cryptosporidium* spp.**

En 1907, Ernest Edward Tizzer aisló de las glándulas gástricas de ratón un parásito que nombró *Cryptosporidium muris* (Sánchez, 2002; Rose *et al.*, 2002) cuatro años después se descubrió en intestino de ratón una segunda especie que se denominó *Cryptosporidium parvum*. Fue hasta 1976 cuando se diagnosticó el primer caso de cryptosporidiosis en humanos y desde entonces es considerado mundialmente como causa de diarrea severa (McAnulty *et al.*, 1994; Rose y Slifko 1999; Rose *et al.*, 2002). Su presencia depende de ciertas características como la edad, la población, la estación del año, encontrándose principalmente en niños de 1-5 años, así como en personas inmunocomprometidas, donde puede ocasionar hasta la muerte (Hass *et al.*, 1999).

Las principales rutas de transmisión de *Cryptosporidium* es fecal-oral, persona-persona y animal-persona debido a la ingestión de agua o comida contaminada (McAnulty *et al.*, 1994; Maier *et al.*, 2000).

Taxonomía. Miembro del género *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) son pequeños parásitos que infectan las microvellosidades de las células epiteliales en el aparato respiratorio y digestivo de vertebrados. Se han descrito varias especies de *Cryptosporidium*. Estas especies parecen ser específicas para una clase de vertebrados: *C. parvum*, *C. muris*, *C. felis* y *C. wrairi* infectan mamíferos, *C. baileyi* y *C. meleagridis*

infectan pájaros, *C. serpentis* infecta reptiles y *C. nasorum* tropical infecta peces. Estas especies se pueden encontrar en ocasiones infectando gatos y borregos y pueden causar infección en una amplio rango de otras especies de mamíferos (Medema, 1999; Rose *et al.*, 2002; Jellison *et al.*, 2002).

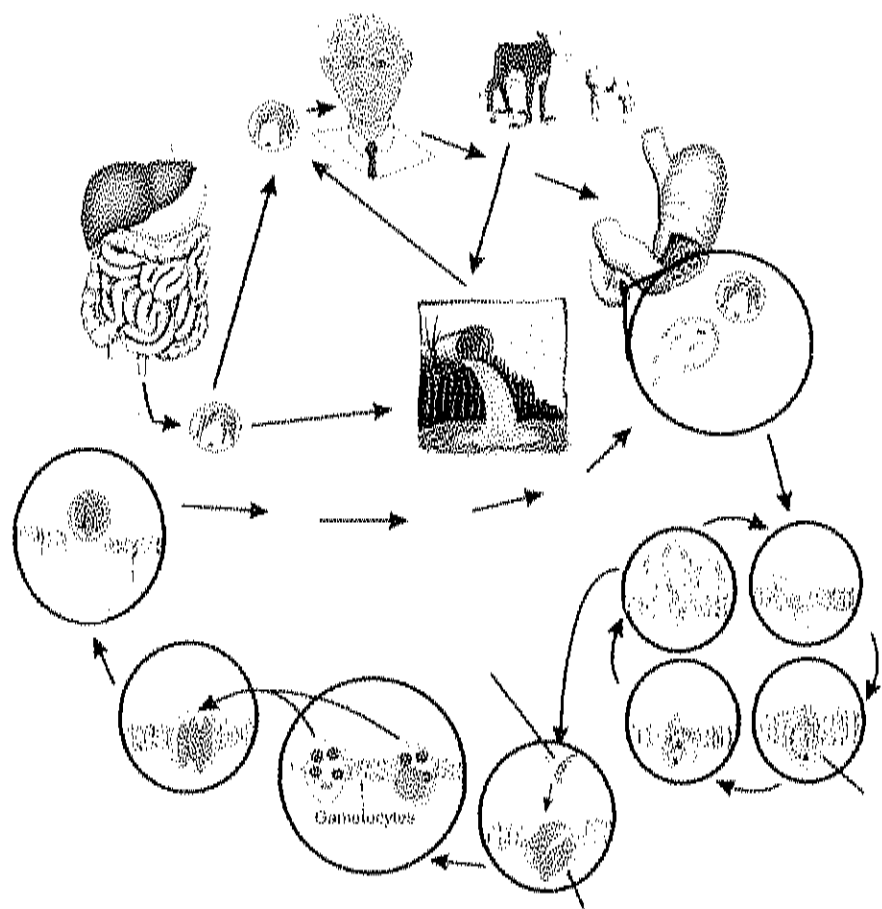
Ciclo de vida. *Cryptosporidium* spp. es monoxeno (completa su ciclo en un huésped). El ciclo de vida ocurre cuando la persona o animal infectado libera ooquistes a través de sus heces fecales, pudiendo permanecer en el ambiente por largos periodos sin perder su viabilidad, debido a la gruesa pared del ooquiste que protege a los esporozoítos (Medema, 1999; Foster *et al.*, 2003). La ingestión de los ooquistes por algún huésped potencial origina la infección.

Una vez que los ooquistes son ingeridos, éstos llegan al tracto gastrointestinal y por acción de los jugos gástricos y sales biliares se liberan 4 esporozoítos que parasitan las células epiteliales del yeyuno e ileón principalmente; el desarrollo de diferentes estadios del parásito ocurren intracelularmente (Maier *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 2003).

Los trofozoítos se multiplican sexualmente y asexualmente. De la reproducción asexual se forman merontes Tipo I (6-8 núcleos) y merontes Tipo II (4 núcleos). El primero produce de 6 a 8 merozoítos que generan autoinfección y el segundo, sólo 4 merozoítos que invaden nuevas células epiteliales y se transforman en microgametos y macrogametos; se fusionan y crean un cigoto. En el cigoto se producen esporozoítos

potencialmente infectivos para constituir el ooquiste. (Medema, 1999; Maier *et al.*, 2000).

Cada generación de parásitos se desarrollan y maduran en un periodo de 12 a 24 horas (Maier *et al.*, 2000). Los ooquiste son esféricos con un diámetro de 4-6µm. Formando ooquistes de pared delgada y gruesa. Los ooquiste de pared delgada pueden desenquistarse dentro del mismo hospedero y comenzar un nuevo ciclo de vida (autoinfección). Mientras que los ooquistes de pared gruesa son liberados al medio ambiente donde permanecen por largos periodos de tiempo (Fig. 3).



Fuente: Maier *et al.*, 2000.

**Figura 3.** Mecanismo de Infección por *Cryptosporidium*

La pared quística gruesa, permite a los ooquistes de *Cryptosporidium* ser resistentes a las concentraciones de cloro empleadas comúnmente en el tratamiento de agua (Rose *et al.*, 1991; Shepherd y Wyns-Jones 1996; Medema *et al.*, 1998; Teunis *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 2001; Dai y Boll, 2003).

Patogenicidad. Diversos estudios han demostrado que *Cryptosporidium parvum* afecta también a personas con sistema inmunológico normal y de cualquier edad, siendo más susceptibles niños y ancianos (Tay, 1994). Estudios realizados con voluntarios saludables mostraron una relación entre la probabilidad de infección y la ingestión de ooquistes de *Cryptosporidium parvum*. Cuando se administró una dosis de 30 ooquistes, la probabilidad de infección fue de 20%. Esta probabilidad incremento a 100% cuando se administraron 1000 ooquistes (Medema, 1999). Ono *et al.* (2001), mencionan que se ha demostrado que la dosis infectiva es de nueve quistes en individuos sanos. Además, apoyados en análisis epidemiológicos se ha demostrado que la infección puede ocurrir con un solo ooquiste.

Enfermedad. El periodo de incubación es de 5 a 28 días, con una media de 7.2 días (Hass *et al.*, 1999). El principal sintoma es la diarrea. Otros síntomas incluyen dolor abdominal, calambres intestinales, vómitos, náuseas, debilidad, fatiga, pérdida de apetito, pérdida de peso y temperatura ligera (<39°) (Teunis *et al.*, 1997; Jellison *et al.*,

2002). La enfermedad es autolimitante en individuos sin problemas inmunológicos ni deficiencias nutricionales, pero la muerte puede ocurrir en individuos inmunodeficientes. Cuando la infección ocurre en inmunodeprimidos se pueden registrar más de 70 evacuaciones por día, con pérdida de hasta 25 litros acompañada de pérdida de peso (Hass *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2000). La infección dura de 7 a 14 días con una media de 23 a 32 días (Medema, 1999).

La excreción de ooquistes por las personas infectadas se encuentra en el rango de  $10^0$  a  $10^{11}$  por gramo de heces (Rose *et al.*, 2002). Estos ooquistes pueden permanecer viables por largos periodos de tiempo; se ha demostrado que los ooquistes de *Cryptosporidium* pueden sobrevivir más de 1 año a 4 °C en agua de mar artificial (Cacciò *et al.*, 2003).

Prevalencia / brotes. La incidencia de cryptosporidiosis en la población se encuentra en un rango de 0.6 a 20 %, dependiendo del área geográfica (Rose y Slifko, 1999). Se estima de 1 a 3 % en Norte América y Europa, de 5 % en Asia, 4 a 13 % en India y 10 % en África (Hass *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 2002). Mientras que en Estados Unidos se estima que un 0.4 a 1 % de los casos de diarrea son producidos por *Cryptosporidium*. Sin embargo, un 30 % de la población probablemente ha sido expuesta a este parásito (Rose y Slifko, 1999).

Por lo menos se han presentado seis brotes de cryptosporidiosis en América del Norte desde 1985. Éstos han ocurrido en Texas, Ontario, Oregón, Pensilvania y

Wisconsin (Johnson *et al.*, 1995). En 1993 ocurrió una epidemia de criptosporidiosis en Milwaukee, Wisconsin, que afectó a 403 mil personas y provocó la muerte de más de 100 personas. En Marzo de 2000, ocurrió un brote de criptosporidiosis en el noroeste de Inglaterra, reportándose 58 casos de diarrea, identificando a *Cryptosporidium parvum* como el agente causal, el cual fue detectado en agua tratada así como en agua potable (Howe *et al.*, 2002).

### ***Giardia spp.***

*Giardia lamblia*, es un protozoario flagelado, descrito por primera vez en 1681 por Antón Van Leeuwenhoek, quien la encontró en sus propias heces, llamándolos "animaluchos". En 1859, Vilem Lambl redescubre *Giardia* encontrando trofozoítos en las heces de su hijo con diarrea, pero no fue hasta 1920 que se comenzó a asociar la diarrea con la presencia de *Giardia* (Hass *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2000).

Taxonomía. *Giardia lamblia* es un protozoario flagelado perteneciente al orden Diplomonadida (Díaz-Carbonell y Fernández-Alonso, 1996), se ha encontrado en más de 40 especies de animales (Adam, 2001). Hasta la fecha se han reportado en la literatura científica, cinco especies de *Giardia*: *G. muris* (presente en roedores, pájaros y reptiles), *G. intestinalis* (sinónimo: duodenalis y lamblia en mamíferos incluyendo al

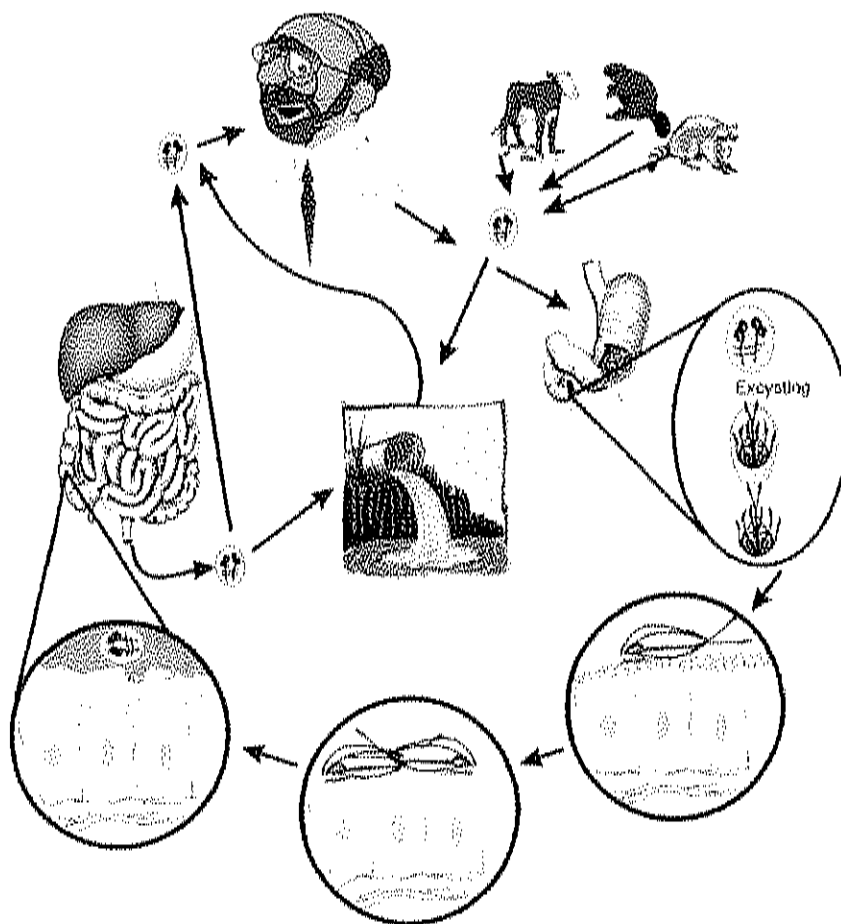


hombre, roedores, reptiles y probablemente pájaros), *G. agilis* (en anfibios), *G. ardae* (en Garza azul) y *G. psittaci* (en pericos) (Medema, 1999).

Ciclo de vida. *Giardia lamblia* se presenta en forma de trofozoito o forma móvil, y quiste o forma de resistencia: el trofozoito es un microorganismo simétrico en forma de corazón, 10 a 20 µm de longitud. Tiene cuatro pares de flagelos, dos núcleos con cariosomas centrales prominentes y dos axostilos. Un gran disco suctor en la porción anterior el cual ocupa gran parte de la superficie ventral (Brooks *et al.*, 2001).

La forma quística o de resistencia de *Giardia* es liberada a través de las heces al medio ambiente, la cual es transmitida a un nuevo hospedero. Una vez que los quistes son ingeridos, éstos pasan al tracto gastrointestinal donde por acción de los jugos gástricos y las sales biliares, son liberados dos trofozoitos que colonizan el intestino delgado del hospedero, principalmente en el yeyuno (Medema, 1999; Maier *et al.*, 1999), donde se multiplican por fisión binaria, favorecida por el pH alcalino de esta zona y permanecen firmemente unidos a las microvellosidades por medio de un potente disco succionador, o bien, pueden encontrarse libres dentro de la luz intestinal; muy raramente invaden aquélla (Díaz-Carbonell y Fernández-Alonso, 1996; Adam, 2001).

La adherencia de los trofozoitos a las células causa mala absorción y diarrea, debido a que no permite la absorción de agua y nutrientes (Medema, 1999). Posteriormente se dirigen al colon, donde *Giardia* genera su estructura quística para ser liberada al medio ambiente (Fig. 4).



Fuente: Maier *et al.*, 2000.

**Figura 4.** Mecanismo de Infección por *Giardia*.

Los quistes excretados en las heces de un hospedero infectado se mueven pasivamente a través del ambiente. Poseen pared quística gruesa y resistente, con tamaño de 8 a 14  $\mu\text{m}$  de longitud y de forma elipsoide, tienen dos núcleos cuando son quistes inmaduros y cuatro cuando maduran, la sobrevivencia de los quistes en el ambiente se ve afectada por la temperatura, disminuyendo conforme aumenta la misma.

Los quistes pueden sobrevivir de 2 a 3 meses en agua cuya temperatura es menor de 10°C y a temperaturas de 21 °C, los quistes pueden permanecer viables por 1 mes. Aunque a temperaturas de 54 °C se pueden inactivar los quistes en un lapso de 10 minutos (EPA, 2000).

Se considera que los quistes de *Giardia* son resistentes a tratamientos de agua convencionales incluyendo la desinfección química por lo que se sugiere que los sistemas para remoción de *Giardia* en agua deben reducir al menos un 99.99 % (Linden *et al.*, 2002).

El periodo de incubación de *Giardia* esta en un rango de 3 a 25 días. Rara vez la infección por *Giardia* causa la muerte, pero cada año 4,600 personas son hospitalizadas en los EUA. De estos casos son principalmente niños menores de 5 años (EPA, 2000). El hombre puede excretar entre  $10^6$ - $10^8$  quistes por gramo por heces (Medema, 1999).

Patogenicidad. Se necesitan consumir menos de 10 quistes para causar la infección; además, es considerada una enfermedad zoonótica, ya que animales como perros, gatos, actúan como reservorios del protozooario (Tay, 1994). Como ocurre con otras parasitosis

intestinales, la giardiasis afecta a individuos de todas las edades (Díaz-Carbonell y Fernández-Alonso, 1996).

Enfermedad. La infección por *Giardia* es llamada giardiasis; un alto porcentaje de la población permanece asintomático. En algunos casos los síntomas pueden desaparecer espontáneamente. El humano se infecta con *Giardia lamblia* por ingerir agua contaminada por materia fecal o alimentos que contengan el quiste, presentando principalmente malestar, debilidad, pérdida de peso, distensión, cólicos abdominales y flatulencia, rara vez se aprecia mucosidad o sangre acompañada de náuseas, anorexia, gorgoteo abdominal y retortijones algunas veces, fiebre moderada y escalofríos (Díaz-Carbonell y Fernández-Alonso, 1996; Teunis *et al.*, 1997; Maier *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 1999).

Prevalencia y brotes. La giardiasis es una parasitosis de distribución mundial, encontrada comúnmente en climas cálidos, sobre todo en ríos, lagos, estanques y arroyos. Afecta con mayor frecuencia a los niños, pudiendo retardar su crecimiento y desarrollo por deficiencia nutrimental (Maier *et al.*, 2000).

En los últimos años *Giardia lamblia* ha sido el agente más identificado en aguas contaminadas y se le ha asociado en brotes producidos en sitios de recreo (albercas) o por alimentos contaminados (Hass *et al.*, 1999). El Centro de Prevención para el Control

de Enfermedades (CDC, 1999) ha estimado que el 60% de todos los casos de giardiasis se asocian al consumo de agua contaminada. Se han reportado 117 brotes de giardiasis en los Estados Unidos de 1960 a 1994. En EUA se han informado brotes epidémicos en centros de esquiar, donde la contaminación del agua por el sistema de alcantarillado han producido brotes súbitos de giardiasis (Brooks *et al.*, 2001).

#### Transporte de *Cryptosporidium* y *Giardia* en Agua

El transporte de microorganismos a través de suelos depende de ciertos factores abióticos (características del suelo y flujo del agua) y bióticos (características que influyen en la sobrevivencia del microorganismo y su actividad) (Maier *et al.*, 2000).

El transporte se ve influenciado por la densidad y tamaño de partícula. Partículas pequeñas y de baja densidad viajan más lentamente que partículas grandes y con alta densidad. La baja densidad de los microorganismos ( $1.1 \text{ g / cm}^3$ ) y su tamaño pequeño (1-2  $\mu\text{m}$ ), determina que una vez que son arrastrados, estos permanecerán en suspensión. También es de esperarse que un microorganismo libre viaje más rápido que aquellos que se encuentren unidos a cualquier partícula (Tyrrel y Quinton, 2003).

La adhesión de los microorganismos a las partículas sólidas, requiere una interacción entre la célula y la superficie de las partículas, a través de diferentes vías como: difusión, transporte o movimiento activo. Una vez que entran en contacto, la adhesión se logra por procesos fisicoquímicos, los cuales pueden ser reversibles e

irreversibles. La adhesión reversible es controlada principalmente por interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals (Maier *et al.*, 2000).

Las interacciones electrostáticas son repulsivas debido a que tanto la célula como la superficie de las partículas tienen cargas negativas. En cambio, las interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals tienden a hacer fuerzas atractivas. La adhesión por tanto ocurre cuando las fuerzas atractivas superan las repulsivas (Maier *et al.*, 2000).

Las interacciones entre el tamaño de las partículas coloidales y el tamaño de los ooquistes y quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia*, depende de cargas electrostáticas y fuerzas superficiales. Las cargas superficiales, parecen gobernar las interacciones entre los ooquistes y las partículas de suelo. Las partículas en solución poseen cargas opuestas que tienden a aglomerarse, mientras que aquellas partículas con la misma carga son repelidas (Dai y Boll, 2003).

Se conoce poco acerca del transporte de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en el ambiente. La información acerca de su transporte es esencial para establecer el riesgo y desarrollar prácticas efectivas de control. Diversos estudios han sugerido que los ooquistes pueden adherirse a partículas sólidas (Feng *et al.*, 2003; DiGiorgio *et al.*, 2002; Dai y Boll, 2003).

El efecto de la turbidez en agua ha sido estudiado ampliamente (Feng *et al.*, 2003). Por ejemplo, en ambientes donde el flujo de agua es lento, es decir, aquellos lugares en donde el agua se encuentra estancada, los ooquistes pueden sedimentar

lentamente. Sin embargo, los oo(quistes) que entran al agua superficial a través de descargas o por resultado de un tratamiento de aguas residuales pueden ligarse a las partículas sólidas y traer como resultado una sedimentación de los mismos. Esta sedimentación dependerá del tamaño y densidad de los oo(quistes) y la densidad y viscosidad del medio de sedimentación (Medema *et al.*, 1998).

En un estudio realizado, por DiGiorgio *et al.* (2002), la turbidez fue el factor principal en recuperar ooquistes de muestras ambientales. Sin embargo es importante señalar, que el método utilizado para la detección de oo(quistes) no fue eficiente.

La recuperación de los ooquistes y quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia*, respectivamente, depende de ciertos factores tales como, la turbidez de las muestras de agua, el filtro utilizado y la pérdida de oo(quistes) durante el procesamiento. La eficiencia de recuperación depende de los niveles de turbidez del agua, de tal manera que a menor turbidez, la recuperación será mayor, que si aumenta la misma. Debido a que al unirse oo(quistes) a las partículas sólidas, éstos quedarán más fácilmente retenidos en el filtro. Sin embargo, si la turbidez del agua sigue en aumento se corre el riesgo, de que el método empleado para detectarlos impida su completa recuperación, al no ser suficientemente eficiente para ello. La contaminación del agua superficial por descargas de agua residuales tratadas y no tratadas, actividades ganaderas, entre otras, aumenta la probabilidad de encontrar ooquistes y quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia*, respectivamente, trayendo como consecuencia que los oo(quistes) sedimenten al aumentar la turbidez del medio y la eficiencia de los métodos empleados disminuya la probabilidad de encontrarlos. Es por ello que al utilizar el agua superficial para el riego,

lavado y desinfección de frutas y hortalizas frescas, represente un verdadero riesgo a la salud de las personas que están en contacto directo con estos productos.

### Método de Detección en el Ambiente

Existen diferentes métodos para detectar ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en agua. Los métodos utilizados para la detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua incluye la filtración de grandes volúmenes de agua (100 a 1000 L), seguidos del lavado del filtro para recuperar los ooquistes, centrifugación, clarificación y finalmente microscopía de epifluorescencia, después tinción con anticuerpos monoclonales (Rose *et al.*, 2002).

El método más utilizado para la detección de ooquistes en muestras ambientales es el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA), en el cual, la muestra es teñida con anticuerpos monoclonales específicos para ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* y examinadas bajo el microscopio de epifluorescencia (Johnson *et al.*, 1995). Sin embargo, existen ciertos factores, como la turbidez que pueden afectar la detección de ooquistes y quistes en aguas ambientales.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) ha establecido el método conocido como Reglas Indispensables para la Colección de las Muestras (ICR, por sus siglas en inglés), el cual es utilizado para detectar ooquistes de *Cryptosporidium* presentes en fuentes de agua. Se propuso entonces el método 1622, el cual fue validado en 1999 y posteriormente modificado y llamado método 1623, el cual



es utilizado actualmente para detectar ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en fuentes de agua superficial tratada o no tratada (Feng *et al.*, 2003).

### **Técnicas de Concentración con Filtros de Polipropileno**

Filtración. Esta metodología utiliza un filtro de polipropileno con tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$ , por medio del cual grandes volúmenes de agua son pasados en un caudal de 1 a 5 litros por minutos. El filtro es cortado y lavado a mano con una solución diluida de detergente. La solución de lavado es concentrado por centrifugación. Éstos métodos que son utilizados para detectar ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*, poseen baja eficiencia, menor al 50%, siendo menor la eficiencia para detectar *Cryptosporidium* (LEChevallier *et al.*, 1995). LEChevallier *et al.* (1991), reportó una eficiencia del 68.6% para quistes de *Giardia* y de 25.3% para ooquistes de *Cryptosporidium*. Algunos estudios reportan una promedio de eficiencia de 11 y 26%. La eficiencia en la recuperación debería ser evaluada frecuentemente para ser capaz de interpretar los datos ambientales (Medema, 1999).

Quintero-Bentacourt y Botero de Ledesma (2000), utilizaron el método de filtración junto con dos técnicas de clarificación, para describir la presencia de quistes de protozoarios, así como bacterias indicadoras en el agua tratada de plantas de Maracaibo, Venezuela.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es uno de las técnicas más empleado para descubrir el género o la especie específica (Rose *et al.*, 2002). Este método amplifica el DNA del protozooario, el producto es separado por electroforesis y se tiñen diferentes pares de bases para identificar al microorganismo. De esta manera se pueden conocer las cepas de protozoarios patógenas al hombre. Sin embargo, a pesar de la especificidad y sensibilidad que el método puede ofrecer, es necesario el cultivo de células antes de llevar a cabo el PCR para determinar la viabilidad del protozoarios.

Johnson *et al.* (1995), realizó PCR para detectar la presencia de *Cryptosporidium* en muestras ambientales, la sensibilidad fue de 1 a 10 ooquistes, la cual se alcanzo con ooquistes purificados, sin embargo la sensibilidad en muestras ambientales fue 1000 veces menor.

### **Método Inmunomagnético**

Este método consiste en incubar los ooquiste de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* que se obtuvieron de las muestras ambientales, con anticuerpos específicos, a continuación se añade un campo magnético, el cual es utilizado para atrapar los ooquistes y quistes sin que interfiera la materia orgánica presente (Hass, 1999). En ocasiones, la unión entre el oo(quiste) y el anticuerpo no es tan fuerte, de tal manera que

la recuperación se ve disminuida. Es por ello un método sencillo, y con varias fuentes de error, como es la baja especificidad de los anticuerpos monoclonales (Medema, 1999).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en dos etapas; primero, se llevo a cabo un análisis exploratorio, el cual consistió en tomar muestras de agua superficial de uso agrícola del valle de Culiacán y de manera descriptiva se cuantificó la presencia de ooquistes y quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia*, respectivamente, los datos obtenidos corroboraron su presencia en el agua de uso agrícola del valle de Culiacán. A continuación, se procedió a visitar empaques agrícolas de la región que utilizan agua superficial para el lavado y desinfección de hortalizas, tinas de lavado para la recepción del fruto y además que contaran con un sistema de espreas. Se eligieron tres empaques, en los cuales se analizó el agua de las tinas de lavado, así como el producto. Se tomaron muestras de fruto antes del lavado en tinas, es decir aquellos frutos que venían directamente de campo, frutos durante el lavado en las tinas y frutos durante el lavado en las espreas y finalmente el fruto empacado, buscando la posible presencia de estos microorganismos protozoarios en la superficie del fruto.

Una vez que localizamos la presencia de ooquistes y quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia*, respectivamente, en tinas y frutos, se procedió a realizar el análisis experimental en el laboratorio, para comprobar que los ooquistes de *Cryptosporidium* pueden permanecer en la superficie de frutos si éstos son regados o lavados con agua contaminada por estos microorganismos protozoarios.

## Estudio Exploratorio

### **Selección de los Puntos de Muestreo**

El análisis se llevo a cabo en el valle Central de Culiacán, Sinaloa, en el periodo comprendido de Febrero-Octubre de 2003. Las muestras de agua fueron tomadas de lugares previamente seleccionados, donde la contaminación de origen humano y animal era evidente. Se tomaron siete puntos centrales de la zona Centro – Sur del valle de Culiacán. En la Fig. 5, se muestra en círculos los lugares seleccionados, en esto puntos se tomaron diferente cantidad de muestras como se aprecia en el Cuadro 3;

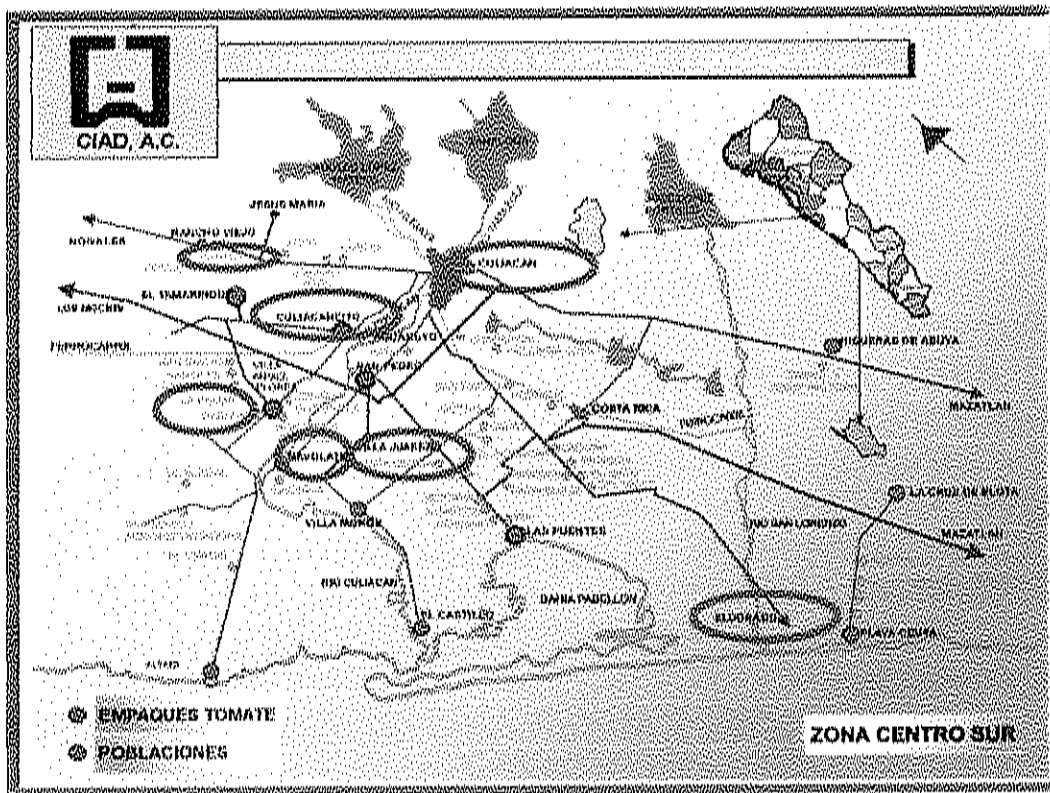


Figura 5. Mapa del Valle de Culiacán, donde se Muestran los 7 Puntos Seleccionados.

**Cuadro 3.** Número de Muestras Tomadas en la Zona Central del Valle de Culiacán.

<i>Zona Centro-Sur</i>	<i>No. de muestras</i>
La Palma	5
Culiacán	17
El Dorado	11
Villa Juárez	11
Navolato	5
Culiacancito	5
Limón de los Ramos	4
Total	58

### **Toma de Muestra Agua Superficial**

Todas las muestras se procesaron de acuerdo al método 1623, establecido por la Agencia de Protección Ambiental, (EPA, 1995). Para ello se utilizó una bomba de gasolina (EFCO, de dos tiempos), para tomar la muestra de agua superficial, la cual se filtró a través de un filtro de polipropileno con una porosidad de 1  $\mu\text{m}$ . La velocidad de flujo se ajustó a 2 gal/min y el volumen filtrado fue de 100 L. Después de la recolección

de la muestra, el filtro se colocó en una bolsa de plástico estéril y se mantuvo a 4 °C hasta su traslado al Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) para su análisis. Donde se almacenaron a 4 °C y se procesaron dentro de las 72 a 96 horas de su llegada.

### **Purificación de Protozoarios de la Muestra**

Cada filtro de muestreo fue cortado longitudinalmente hasta el centro, utilizando un cuchillo esterilizado. Las fibras del filtro obtenidas se dividieron en un mínimo de seis partes iguales y se lavaron en tres volúmenes consecutivos de 1 L de solución eluyente (Mezcla de Buffer de fosfatos, a concentración 1X, duodecil sulfato de sodio y Tween 80 a pH 7.4), durante 30 minutos. Posteriormente las fibras se homogenizaron y se agregaron en 1.75 L de solución eluyente durante 5 minutos. Después del segundo proceso de homogenización, las fibras se oprimieron manualmente y finalmente se lavaron con 1 L de solución eluyente, para arrastrar los protozoarios presentes. La solución de lavado se centrifugo a 1050 x g por 10 minutos (Centra CL3 Thermo IEC, rotor # 243). El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en solución eluyente. Este paso se repitió hasta que se obtuvo todo el sedimento de la muestra y se colocó en un tubo cónico de 50 mL. El sobrenadante se decanto de nuevo y el pellet se resuspendió en formalina al 10%. Todas las muestras se almacenaron a 4 °C previo al proceso de purificación por flotación.



### **Purificación por Flotación**

El pellet obtenido se resuspendió en 30 mL de solución de percoll-sucrosa (gravedad específica; 1.1; Sigma) y se llevó a un volumen final de 50 mL con solución eluyente, se centrifugó a 1050 x g por 10 minutos. Posteriormente se tomaron 20 mL de la interfase y 5 mL de la parte inferior. Se añadió solución eluyente hasta completar un tubo cónico de 50 mL y centrifugar a 1050 x g por 10 min. El sobrenadante se decanto y se dejaron 5 mL del concentrado. Este concentrado se agitó vigorosamente para utilizarlo en el proceso de tinción.

### **Tinción**

Las muestras fueron colocadas sobre un filtro pre-humedecido de acetato de celulosa de 25 mm (0.22  $\mu$ m tamaño de poro; Millipore), para asegurar una distribución homogénea de la muestra. Un filtro de acetato de celulosa de 25 mm (Grado 1) se utilizó en cada muestra. Cada filtro se enjuagó con 2 mL de suero de albúmina bovina al 1%, se prepararon de acuerdo al instructivo, 0.5 mL de anticuerpo monoclonal (A200 FL-1X Aqua Glo G/C Indirect) para *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp., utilizando PBS 1X (Solución Buffer de Fosfatos pH 7.4). Después se incubaron por 25 min / 37 °C y se enjuagó cinco veces con 2 mL de PBS 1X. Enseguida se aplicó 0.5 mL del segundo anticuerpo, el cual se volvió a incubar durante 25 min / 37 °C. Posteriormente se enjuagó 5 veces con 2 mL de solución de PBS 1X.

## Microscopía

La membrana se lavó con solución de alcohol (10, 20, 40, 80 y 90.2% etanol- solución de glicerol al 5%). Las membranas se colocaron en una placa con DABCO- glicerol al 2%. A continuación se colocó un cubreobjetos a la placa y se selló con esmalte, para posteriormente observarlas, utilizando un microscopio de epifluorescencia (Leica DME con un filtro de isotiocianato de fluoresceína) a 40 X. Los quistes y ooquistes se identificaron por el tamaño, forma y fluorescencia bajo la luz del microscopio de epifluorescencia.

## Reporte de Resultados

La presencia de ambos protozoarios se reporta en número de microorganismos por cada 100 litros de agua superficial filtrada. Cuando no se encontraron presentes, se reportó como el límite inferior de detección  $<16.66$  oo(quistes / 100 L).

$$\text{Quistes u ooquistes / 100 L} = \frac{\text{Número de oo(quistes) encontrados} \times 100}{\text{FVR}}$$

FVR

Cuando no se detectaron oo(quistes) se reportó de siguiente manera:

$$\text{Quistes u ooquistes / 100 L} = \frac{<1 \times 100}{\text{FVR}}$$

FVR

Donde:

F = Fracción de sedimento llevado a flotación.

V = Volumen de muestra tomada.

R = Porcentaje de sedimento examinado.

### **Selección de Empaques Agrícolas**

Se seleccionaron tres empaques agrícolas, la selección de los empaques se llevó a cabo utilizando como criterios:

- a). Aquellos que utilizaban el agua superficial para el lavado y desinfección de frutas y hortalizas.
- b). Que contaban con tinas de lavado para la recepción del fruto y,
- c). Que contaban con un sistema de espreas.

Las tinas destinadas para el lavado y desinfección de productos frescos, presentaron volúmenes variables de 10,000 a 20,000 litros y concentraciones de cloro total de 150 a 300 mg/L con un tiempo de contacto de la hortaliza de 2 minutos.

Se evaluaron cuatro tinas de lavado seleccionadas de los empaques previamente elegidos, denominados como empaque A, empaque B y empaque C, en cada empaque se evaluó por duplicado la tina de lavado.

## **Frutos Analizados**

Para el análisis de esta variable se tomaron frutos que procedían directamente de campo, frutos de tinas de lavado, frutos que se encontraron en las espreas y frutos empacados, se tomó una muestra de cada fuente y se analizaron utilizando el método de inmunofluorescencia 1623.

## Estudio Experimental

El estudio experimental se llevo a cabo para determinar la capacidad *in vitro* de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* de adherirse a la superficie de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), simulando condiciones de tina de lavado y espreas de empaques agrícolas, utilizando el método de inmunofluorescencia 1623.

Los frutos de tomate, fueron adquiridos de los supermercados de Culiacán. La muestra se transportó al Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) para su posterior análisis. Una vez en el laboratorio los frutos fueron lavados con agua potable y desinfectados con luz U.V., durante 1 hora.

Un control positivo de *Cryptosporidium parvum* fue obtenido del Laboratorio de Microbiología Ambiental de Suelos y Agua de la Universidad de Arizona a cargo del Dr. Charles P. Gerba. El control fue preservado en PBS, 1000 U de penicilina y 1000 µg de estreptomina.

## Frutos Analizados

Para el análisis de esta variable se tomaron frutos que procedían directamente de campo, frutos de tinas de lavado, frutos que se encontraron en las espreas y frutos empacados, se tomó una muestra de cada fuente y se analizaron utilizando el método de inmunofluorescencia 1623.

## Estudio Experimental

El estudio experimental se llevo a cabo para determinar la capacidad *in vitro* de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* de adherirse a la superficie de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), simulando condiciones de tina de lavado y espreas de empaques agrícolas, utilizando el método de inmunofluorescencia 1623.

Los frutos de tomate, fueron adquiridos de los supermercados de Culiacán. La muestra se transportó al Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) para su posterior análisis. Una vez en el laboratorio los frutos fueron lavados con agua potable y desinfectados con luz U.V., durante 1 hora.

Un control positivo de *Cryptosporidium parvum* fue obtenido del Laboratorio de Microbiología Ambiental de Suelos y Agua de la Universidad de Arizona a cargo del Dr. Charles P. Gerba. El control fue preservado en PBS, 1000 U de penicilina y 1000 µg de estreptomocina.

Las concentraciones de inóculo que se utilizaron en los ensayos *in vitro*, se determinaron de acuerdo a los valores encontrados en el agua de uso agrícola del valle de Culiacán, anteriormente analizados, utilizando una concentración alta, media y baja (10,000, 1,000 y 100 ooquistes / L). El análisis de los frutos en estudio se realizó como a continuación se especifica:

#### **Simulación Tinajas de Lavado**

Para tinajas de lavado, se utilizó un contenedor de 4 litros, al cual se le agregó el inóculo previamente preparado con agua purificada (10,000, 1,000, 100 ooquistes / L). Se utilizó como desinfectante hipoclorito de sodio en concentraciones de 100 y 300 ppm de cloro libre, el cual se midió utilizando un espectrofotómetro marca HACH modelo DR 2010, de acuerdo a la APHA (1998) y se adicionó al contenedor, así mismo, se simuló dos niveles de turbidez (2 y 100 UNT) utilizando tierra estéril, cuyas características se aprecian en los Anexos. La turbidez se determinó utilizando un espectrofotómetro marca HACH modelo DR 2010, de acuerdo a la APHA (1998). A continuación se añadió el fruto de tomate entero y se le dio un tiempo de contacto de 2 minutos. Se realizaron dos replicas por tratamiento.

Con la finalidad de corroborar la efectividad del cloro se midió el pH, el cual se determinó utilizando un equipo manual marca Hanna HI 9813 Grochek meter range pH 0 -14.

### **Simulación Espreas**

Para simular condiciones de espreas, se utilizaron atomizadores manuales, a los cuales se les agrego el inoculo (10,000, 1,000, 100 ooquistes / L), se utilizo como desinfectante hipoclorito de sodio en concentraciones de 100 y 300 ppm de cloro libre, el cual se midió utilizando un espectrofotómetro marca HACH modelo DR 2010, de acuerdo a la APHA (1998).y se procedió a asperjar los frutos enteros, y se le dio un tiempo de contacto de 30 segundos. Se realizaron dos replicas por tratamiento.

Se midió pH utilizando un equipo manual marca Hanna HI 9813 Grochek meter range pH 0 -14.

Finalmente, después del tiempo de contacto de los frutos enteros durante la simulación de las tinas y espreas de lavado, se dejaron secar durante 20 min para posteriormente lavarlos con solución eluyente. La relación P/V (Peso/Volumen) de solución eluyente utilizada fue de 1:2.

### **Purificación de Protozoarios de la Muestra**

Se utilizaron tres frutos enteros por tratamiento, y se procedió a realizar la simulación de tinas y/o espreas, después de cada tratamiento, se seleccionaron dos fruto enteros, los cuales fueron lavados en una relación 1:2 (P/V) de solución eluyente (Mezcla de Buffer de fosfatos, a concentración 1X, duodecil sulfato de sodio y Tween 80 a pH 7.4), durante 15 minutos para desprender los ooquistes de *Cryptosporidium*

*parvum* que se quedaron adheridos al fruto. La solución de lavado se centrifugo a 1050 x g por 10 minutos (Centra CL3 Thermo IEC, rotor # 243). El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en solución eluyente. Este paso se repitió hasta que se obtuvo todo el sedimento de la muestra y se colocó en un tubo cónico de 50 mL. El sobrenadante se decanto y se procedió a realizar la purificación de los ooquistes por flotación.

### **Purificación por Flotación**

El pellet obtenido se resuspendió en 30 mL de solución de percoll-sucrosa (gravedad específica; 1.1; Sigma) y se llevó a un volumen final de 50 mL con solución eluyente, se centrifugó a 1050 x g por 10 minutos. Posteriormente se tomaron 20 mL de la interfase y 5 mL de la parte inferior. Se añadió solución eluyente hasta completar un tubo cónico de 50 mL y centrifugar a 1050 x g por 10 min. El sobrenadante se decanto y se dejaron 5 mL del concentrado. Este concentrado se agitó vigorosamente para utilizarlo en el proceso de tinción.

### **Tinción**

Las muestras fueron colocadas sobre un filtro pre-humedecido de acetato de celulosa de 25 mm (0.22  $\mu$ m tamaño de poro; Millipore), para asegurar una distribución



homogénea de la muestra. Un filtro de acetato de celulosa de 25 mm (Grado 1) se utilizó en cada muestra. Cada filtro se enjuagó con 2 mL de suero de albúmina bovina al 1%, se prepararon de acuerdo al instructivo, 0.5 mL de anticuerpo monoclonal (A200 FL-1X Aqua Glo G/C Indirect) para *Cryptosporidium* spp., utilizando PBS 1X (Solución Buffer de Fosfatos pH 7.4). Después se incubaron por 25 min / 37 °C y se enjuagó cinco veces con 2 mL de PBS 1X. Enseguida se aplicó 0.5 mL del segundo anticuerpo, el cual se volvió a incubar durante 25 min / 37 °C. Posteriormente se enjuagó 5 veces con 2 mL de solución de PBS 1X.

### **Microscopía**

La membrana se lavó con solución de alcohol (10, 20, 40, 80 y 90.2% etanol-solución de glicerol al 5%). Las membranas se colocaron en una placa con DABCO-glicerol al 2%. A continuación se colocó un cubreobjetos a la placa y se selló con esmalte, para posteriormente observarlas, utilizando un microscopio de epifluorescencia (Leica DME con un filtro de isotiocianato de fluoresceína) a 40 X. Los ooquistes se identificaron por el tamaño, forma y fluorescencia bajo la luz del microscopio de epifluorescencia.

## Reporte de Resultados

La adherencia de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* se reporto por número de ooquiste por gramo de muestra analizada.

$$\text{ooquistes / gr de fruto tomate} = \frac{\text{Número de ooquistes encontrados} \times \text{gr}}{\text{FVR}}$$

Donde:

F = Fracción de sedimento llevado a flotación.

V = Volumen de solución eluyente tomada.

R = Porcentaje de sedimento examinado.

### Metodología de la Eficiencia de Recuperación del Método de Inmunofluorescencia 1623

La eficiencia del método de inmunofluorescencia 1623, se realizó utilizando ooquistes de *Cryptosporidium parvum*. Para realizar la eficiencia se utilizo una concentración stock de  $2.68 \times 10^7$  ooquistes/ ml, la cual se determinó de la siguiente manera:

Se tomo la muestra stock y se monte en una cámara de Neubauer, para conocer la concentración que tenía utilizando la siguiente fórmula:

$$\# \text{ de ooquistes / ml} = (\# \text{ de ooquistes contados} / \# \text{ de cuadrados mm contados}) \times (10/1 \text{ mm}) \times (\text{factor de dilución}/1) \times 1,000 \text{ mm}^3/1 \text{ ml}$$

A continuación se agregaron 5 ml del stock a 1 L de agua purificada, por lo tanto, la concentración que final fue de  $1.34 \times 10^8$  ooquiste / ml, esta concentración se agitó alrededor de 20 min. A continuación esta solución se pasó a un rotoplas de 200 L de capacidad al cual previamente se le agregaron 199 L de agua y tiosulfato al 2% (250 mL / 100L), para neutralizar el cloro presente, se agitó vigorosamente para obtener una buena homogenización. Para asegurar un volumen exacto de 199 L de agua al rotoplas se midió utilizando una probeta graduada.

Se hicieron pasar 76 L de agua que menciona el método de inmunofluorescencia 1623 para la toma de muestra y posteriormente se colocó un filtro de polipropileno de 1  $\mu\text{m}$  de porosidad y se hizo pasar 100 L de muestra del rotoplas, hecho esto se procedió a lavar el filtro. Una vez lavado el filtro, el agua de lavado se centrifugó durante 10 minutos a  $1,500 \times g$  hasta que obtener un pellet final el cual se utilizó para llevar a cabo la flotación de los ooquistes.

Una vez hecha la flotación se dejaron 5 ml de muestra por encima del pellet, se agitó y de aquí se tomaron 0.3 ml de muestra, la cual fue colocada sobre un filtro pre-humedecido de acetato de celulosa de 25 mm (0.22  $\mu\text{m}$  tamaño de poro; Millipore), para

asegurar una distribución homogénea. Un filtro de acetato de celulosa de 25 mm (Grado 1) se utilizó en cada muestra. Cada filtro se enjuagó con 2 mL de suero de albúmina bovina al 1%. Los anticuerpos se prepararon de acuerdo al instructivo; 0.5 mL de anticuerpo monoclonal (A200 FL-1X Aqua Glo G/C Indirect) para *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp., utilizando PBS 1X (Solución Buffer de Fosfatos pH 7.4). Después se incubaron por 25 min / 37 °C, transcurrido este tiempo se enjuagó cinco veces con 2 mL de PBS 1X. Enseguida se aplicó 0.5 mL del segundo anticuerpo, el cual se volvió a incubar durante 25 min / 37 °C. Posteriormente se enjuagó 5 veces con 2 mL de solución de PBS 1X.

La membrana se lavó con solución de alcohol (10, 20, 40, 80 y 90.2% etanol-solución de glicerol al 5%). Las membranas se colocaron en una placa con DABCO-glicerol al 2%. A continuación se colocó un cubreobjetos a la placa y se selló con esmalte, para posteriormente observarlas utilizando un microscopio de epifluorescencia (Leica DME con un filtro de isotiocianato de fluoresceína) a 40 X. Los quistes y ooquistes se identificaron por el tamaño, forma y fluorescencia bajo la luz del microscopio de epifluorescencia.

Finalmente la cantidad total de ooquistes observados en el microscopio se obtuvieron utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Ooquistes / 100 L} = \frac{\text{Número de oo(quistes) encontrados} \times 100}{\text{Volumen de muestra}}$$

A continuación se realizaron los cálculos de acuerdo a los 0.3 ml. que se tiñeron y se utilizó la siguiente fórmula:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Donde:

$C_1$  = Concentración inicial

$V_1$  = Volumen inicial

$C_2$  = Concentración final

$V_2$  = Volumen final.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico está dividido en dos partes, de acuerdo con el desarrollo del trabajo de campo y experimental; una parte descriptiva y una parte experimental. La parte descriptiva del estudio consistió en analizar el agua superficial de uso agrícola, tinajas de lavado de tres empaques agrícolas y los frutos del empaque (procedentes de la batanga, tinajas de lavado, espreas y frutos empacados).

La parte experimental consistió en simular condiciones de tinajas de lavado y condiciones de espreas, los datos obtenidos de ambos experimentos se analizaron por separado.

El experimento de simulación de tinajas de lavado consistió en evaluar tres concentraciones de inóculo, dos niveles de turbidez y dos niveles de cloro libre, utilizando un diseño de tres factores totalmente al azar con dos réplicas. Los factores fueron:

- Inóculo: 10,000, 1,000 y 100 ooquistes / L.
- Cloro: 100 y 300 ppm.
- Turbidez: 2 y 100 NTU.

El experimento de simulación de espreas de lavado consistió en evaluar tres concentraciones de inóculo y dos niveles de cloro libre, con un diseño de 2 factores totalmente al azar con dos réplicas. Los factores fueron:

- Inóculo: 10,000, 1,000 y 100 ooquistes / L.
- Cloro: 100 y 300 ppm.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el paquete estadístico Minitab, Versión 14, realizando un análisis de varianza en aquellos resultados que resultaron significativos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Resultados Estudio Exploratorio

Se analizaron un total de 58 muestras de agua superficial del Valle de Culiacán (Cuadro 4). Las muestras incluyeron fuentes de agua de canal (49), agua residual de uso agrícola (4) y ríos (5) (Cuadro 5).

El porcentaje de muestras que contenían quiste de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* se muestra en el Cuadro 5. Los rangos y medias geométricas se listan en el Cuadro 6. Se observó una media geométrica de 82.3447 quistes / 100 litros para los quistes de *Giardia*, en un rango de 16.66 –1633.33. Mientras que *Cryptosporidium* se detectó con una media geométrica de 32.9452 ooquistes / 100 litros en un rango de 16.66 – 200. De acuerdo con Rose *et al.* (1989), el número de quistes y ooquiste en agua son bajos en comparación con los encontrados en muestras fecales, y que algunos contaminantes pueden interferir en la detección de estos microorganismos. El método de inmofluorescencia puede detectar 0.25 ooquistes y quistes / 100 litros (Rose *et al.*, 1989).

En general, se encontró la presencia de protozoarios en el 98.2% de las muestras analizada y solo el 36.2 % de las muestras fueron positivas para ambos protozoarios, lo cual se puede comparar con lo reportado por LeChevallier *et al.* (1991), donde demostraron que de 66 muestras de agua superficial tomadas en Estados Unidos y Canadá, 81% contenían quistes de *Giardia* y 87% contenían ooquistes de



*Cryptosporidium*. El promedio de ambos protozoarios fue detectado en 97% de las muestras de agua.

La eficiencia para detectar quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* es menor al 50%, siendo menor la eficiencia para detectar *Cryptosporidium* (LEChevallier *et al.*, 1995). LEChevallier *et al.* (1991), reportaron una eficiencia del 68.6% para quistes de *Giardia* y de 25.3% para ooquistes de *Cryptosporidium*. Algunos estudios reportados por Rose *et al.* (1991), LEChevallier *et al.* (1991) y LEChevallier *et al.* (1995), reportan un promedio de eficiencia de 11 y 26%. Estos datos coinciden con la eficiencia obtenida en el presente estudio para los ooquistes de *Cryptosporidium*, el cual estuvo en el rango de 16.20-33.75 con una media geométrica de 22.85%.

La mayor concentración de estos parásitos en agua superficial se han detectado en lugares cerca de descargas de agua residuales (LEChevallier *et al.*, 1991), en el Cuadro 4 se muestra que el lugar donde se presenta la mayor concentración de parásitos en el agua residual de uso agrícola principalmente en Culiacancito. En el Cuadro 5 se muestra como algunas de las muestras analizadas en este estudio, presentaron una mayor concentración de protozoarios (100% de las muestras analizadas), debido a que fueron tomadas de aguas superficiales que reciben aguas residuales urbanas y agrícolas.

El método empleado detecta solo la presencia de *Giardia* y *Cryptosporidium*, sin determinar la viabilidad de los ooquistes y quistes. En este estudio no se determinó la viabilidad en ninguna de las muestras de agua; sin embargo, estudios previos han determinado la resistencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* a desinfectantes de agua

(Liyange *et al.*, 1997; Weir *et al.*, 2002), además de que son capaces de sobrevivir en el ambiente por periodos de tiempo largo (Kuczynska y Shelton, 1999).

Se detectaron quistes de *Giardia* en 29/58 (50%) de las muestras analizadas, mientras que los ooquistes de *Cryptosporidium* se hallaron en menor frecuencia 28/58 (48.3%). Estos resultados indican que estos patógenos están presentes en el agua de irrigación del Valle de Culiacán y que ambos presentan alta probabilidad de encontrarse en la superficie de frutas y hortalizas que son irrigadas o lavadas con esta agua. En un estudio realizado por Monge *et al.* (1996), donde encontraron la presencia de ooquiste de *Cryptosporidium* en la superficie de hortalizas frescas, asumieron que su presencia podía deberse al uso de agua de irrigación contaminada. En el Cuadro 7, se muestran los tipos de frutas, hortalizas y granos que son irrigados por el agua superficial analizada.

El agua superficial, además de ser usada para irrigar los cultivos agrícolas, es utilizada por algunos empaques para lavar y desinfectar las frutas y hortalizas. Debido a que *Giardia* y *Cryptosporidium* son capaces de soportar los desinfectantes comúnmente empleados pueden quedarse adheridos a la superficie del fruto, incrementando de esta manera, el riesgo de infección en personas que están en contacto directo con estas frutas y hortalizas.

Se analizaron tres empaques agrícolas, los cuales utilizan el agua superficial para el lavado y desinfección de frutas y hortalizas, los resultados obtenidos indican la presencia de ambos protozoarios: Los ooquistes de *Cryptosporidium* en un rango de 133.33 ooquistes / 100L, y quistes de *Giardia* se detectó en un rango de 116.71 – 600.60 quistes / 100 L (Cuadro 8).

Asimismo se evaluaron los frutos provenientes del campo, frutos de las tinajas y espreas de lavado y finalmente el producto empacado. Buscando la probabilidad de que ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* se encontraran presentes. Los resultados se muestran en el Cuadro 9.

**Cuadro 4.** Concentración de *Cryptosporidium* y *Giardia* / 100 l de Muestra

<b>Población Zona</b> <b>Centro-Sur</b>	<b><i>Cryptosporidium</i></b>	<b><i>Giardia</i></b>
<b>LA PALMA</b>		
Canal Lo de Verdugo (LV)	<16.66	<16.66
Canal Lo de verdugo (LV2)	<16.66	<16.66
Canal Almada (CA)	<16.66	50
Canal lo de Beltrán (CLB)	133.33	116.66
Canal Santa Fe (SFe)	66.66	150
<b>CULIACÁN</b>		
Canal Empaque Batam (BT1)	<16.66	<16.66
Canal Empaque Batam (BT2)	<16.66	<16.66
Canal Empaque Batam (BT3)	<16.66	<16.66
Canal Empaque Batam (BT4)	33.33	<16.66
Canal Rosales (CR1)	<16.66	<16.66
Canal Rosales (CR2)	16.66	<16.66

<b>Población Zona Centro-Sur</b>	<b><i>Cryptosporidium</i></b>	<b><i>Giardia</i></b>
Canal Presa Derivadora (PD)	<16.66	33.33
Canal Aguaruto (CAg)	<16.66	<16.66
Canal San Miguel (CSM)	<16.66	<16.66
Canal Seminario (Cse1)	33.33	916.66
Canal Seminario (CSe2)	16.66	100
Río Tamazula (RT)	<16.66	<16.66
Río Humaya (RH)	66.66	<16.66
Río Culiacán Puente Negro (RCPN)	<16.66	50
Canal Costa Rica (CR)	<16.66	<16.66
Canal Crisantes (Cri)	<16.66	<16.66
Canal El Ranchito (ER)	16.66	<16.66

### **EL DORADO**

Canal Paredes (PR1)	<16.66	<16.66
Canal Paredes (PR2)	<16.66	<16.66
Canal Paredes (PR3)	66.66	133.33
Canal Empaque del Valle (CEV1)	16.66	83.33
Canal Empaque del Valle (CEV2)	200	250

<b>Población Zona</b> <b>Centro-Sur</b>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
Canal Eureka (CE1)	16.66	116.66
Canal Eureka (CE2)	33.33	50
Canal Eureka (CE3)	<16.66	<16.66
Canal Sánchez Celis (CSCe)	<16.66	<16.66
Campo el Chapo (CCH)	16.66	33.33
Canal las Piedritas (Cpi)	<16.66	<16.66
<b>VILLA JUÁREZ</b>		
Canal El Porvenir (PV1)	<16.66	<16.66
Canal El Porvenir (PV2)	<16.66	<16.66
Canal El Porvenir (PV3)	<16.66	<16.66
Canal Alamito (CAL)	16.66	<16.66
Canal Estrella (CE)	16.66	<16.66
Canal Estrella (CE)	16.66	<16.66
Canal Paralelo 38 (P38)	<16.66	33.33
Canal Santa Cecilia (CSC)	<16.66	<16.66
Canal Campo la Flor (CF)	16.66	16.66

<b>Población Zona Centro-Sur</b>	<b><i>Cryptosporidium</i></b>	<b><i>Giardia</i></b>
Campo el Chapo (CCH)	16.66	33.33
Canal La Guajira (Gua)	<16.66	16.66
<b>NAVOLATO</b>		
Canal Acometa (CAT)	<16.66	<16.66
Canal San Pedro (CSP)	<16.66	<16.66
Canal Aeródromo (CAD)	16.66	100
Canal 5 Hermanos (CSH)	16.66	33.33
Río Culiacán San. Pedro (RCSP)	33.33	183.33
<b>CULIACANCITO</b>		
Canal Bella Vista (CB)	<16.66	50
Dren Cedritos (DC1)	83.33	1633.33
Dren Cedritos (DC2)	66.66	166.66
Dren Cedritos (DC3)	183.33	1566.66
Dren Cedritos (DC4)	16.66	50

---

<b>Población Zona</b>	<b><i>Cryptosporidium</i></b>	<b><i>Giardia</i></b>
<b>Centro-Sur</b>		
<b>LIMÓN DE LOS RAMOS</b>		
Canal Limón de los Ramos (LR)	50	133.33
Tamarindo (Ta)	<16.66	16.66
Río Humaya Mojolo (RHM)	<16.66	16.66
Canal Mariquitas (CSM)	50	66.66

---



**Cuadro 5.** Porcentaje de Muestras que Contienen Ooquistes de *Cryptosporidium* y Quistes de *Giardia*.

Fuente de Agua de Irrigación	No. de muestras	Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i>	Quistes de <i>Giardia</i>	Ambos protozoarios
Canal	49	44.89	44.89	32.65
Canal agrícola de agua residual	4	100	100	100
Río	5	40	60	20

**Cuadro 6.** Concentración y Promedio de las Muestras Positivas para Ooquistes de *Cryptosporidium* y Quistes de *Giardia*.

Protozoarios	Rango	Media Geométrica
<i>Giardia</i> (Quistes y Ooquistes / 100 L)	16.66-1633.33	82.3447
<i>Cryptosporidium</i> (Quistes y Ooquistes / 100 L)	16.66-200	32.9452

**Cuadro 7.** Tipos de Productos que Pueden ser Irrigados con el Agua Superficial Analizada.

Fuente de Agua de Irrigación	No. de muestras	Frutas y hortalizas impactadas	Uso de agua de lavado
Canal	49	Tomate, pepino, chile Bell	Si
Canal agrícola de agua residual	4	Maíz, frijol	No
Río	5	Tomate, pepino	No

**Cuadro 8.** Concentración y Promedio de las Muestras Positivas para Ooquistes de *Cryptosporidium* y Quistes de *Giardia*, en Empaques Agrícolas del Valle de Culiacán.

Protozoarios	Número de Muestras	Quistes y Ooquistes / 100L	
		Rango	Media Geométrica
Quistes de <i>Giardia</i>	8	100-533	190.2088
Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i>	8	<1- 133.33	133.33

**Cuadro 9.** Concentración de Muestras Positivas para Ooquistes de *Cryptosporidium* y Quistes de *Giardia*, en Empaques Agrícolas del Valle de Culiacán.

Fruto	Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> / gr de fruto	Quistes <i>Giardia</i> / gr de fruto
Batanga	-	-
Tina de Lavado	5,000	-
Espreas	-	6006.06
Empacado	-	-

### Resultados Estudio Experimental

Los datos obtenidos sobre la presencia de *Cryptosporidium parvum* en la superficie de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), se presentan por separado para la simulación de tinas de lavado y para la simulación de espreas, discutiendo efectos principales e interacciones significativas.

Los resultados obtenidos en el ensayos *in vitro*, muestran que los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* son capaces de adherirse a la superficie de tomate.

#### Análisis de Varianza Simulación Tinas de Lavado

En la tabla ANOVA para la simulación en tinas de lavado (Cuadro 9); se muestra que solo el factor inóculo resultó significativo ( $p = 0.03$ ). De las interacciones realizadas solo la interacción Inóculo - Turbidez resulto significativa ( $p = 0.018$ ).

Las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ); encontrando diferencias significativas en el factor inóculo y la interacción Inóculo - Turbidez.

**Cuadro 10.** ANOVA de Simulación de Tinajas de Lavado.

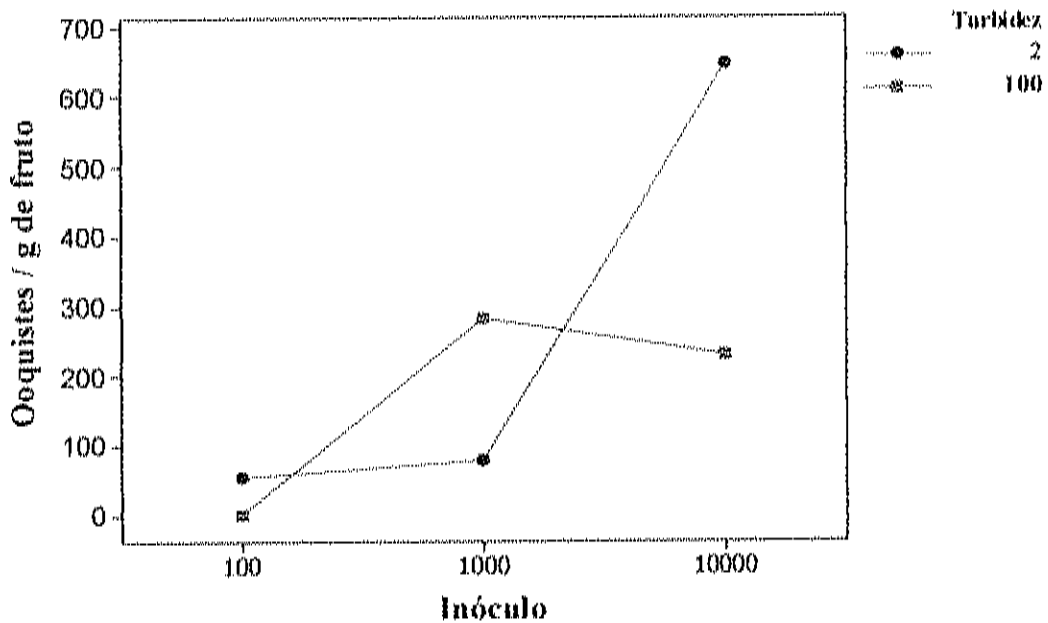
<b>Fuente</b>	<b>G.L</b>	<b>Seq SS</b>	<b>Adj SS</b>	<b>Adj MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Inóculo</b>	2	687148	687148	343574	10,07	<b>0,003</b>
Cloro	1	77037	77037	77037	2,26	0,159
Turbidez	1	48096	48096	48096	1,41	0,258
Inóculo*Cloro	2	41735	41735	20867	0,61	0,559
<b>Inóculo*Turbidez</b>	2	388645	388645	194322	5,69	<b>0,018</b>
Cloro*Turbidez	1	4965	4965	4965	0,15	0,710
Inóculo*Cloro*Turbidez	2	33807	33807	16903	0,50	0,621
Error	12	409576	409576	34131		
Total	23	169	10080			

### Efectos de Interacción

#### **Interacción Inóculo – Turbidez**

En lo que respecta a los efectos de interacción (Fig.6), se observa que resultó estadísticamente significativa la interacción Inóculo – Turbidez. Apreciándose que a medida que aumenta la turbidez, la probabilidad de encontrar ooquistes de *Cryptosporidium parvum* adheridos a la superficie del fruto, es menor, que cuando se tienen bajos niveles de turbidez.





**Figura 6.** Efectos de Interacción Inóculo – Turbidez sobre la Presencia de Ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en Frutos de Tomate, Simulando Condiciones de Tinajas de Lavado.

Diversos estudios han sugerido que los ooquistes pueden adherirse a partículas sólidas (Feng *et al.*, 2002; DiGiorgio *et al.*, 2002; Dai y Boll, 2003). De acuerdo a Dai y Boll (2003), las partículas en solución poseen cargas opuestas a las cargas que presentan los ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, de tal manera que tienden aglomerarse. Sin embargo, es importante señalar que los métodos utilizados para su detección, no son tan eficientes en la recuperación total de los ooquistes, como lo demostró DiGiorgio *et al.* (2002).

Por lo que altas concentraciones del inóculo (10,000 ooquistes / L) y menor turbidez (2 NTU), presenta mayor probabilidad de que los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* queden adheridos en la superficie del fruto de tomate, sin importar las concentraciones de cloro utilizadas, de tal manera que a menor turbidez la adherencia es mayor debido a que no existe interferencia con la materia orgánica presente. Sin embargo, para la más alta concentración de turbidez (100 NTU), la adherencia de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* es menor. Esto puede deberse a la posibilidad que los ooquistes se adhieran a las partículas de suelo que son de mayor tamaño y mayor densidad y según lo reportado por Medema *et al.* (1998), al unirse los ooquistes y la materia éstos puedan sedimentar más rápidamente y disminuir así su recuperación. Se puede observar en la Figura 6 que a medida que aumenta la concentración de inóculo (1000 ooquistes / L), los ooquistes se adhieren a la superficie del fruto, pero llega un momento en que por más alta que se la concentración de inóculo (10000 ooquistes / L) no existe adherencia y por tanto existe menor recuperación. Se debe considerar que en una tina de lavado el flujo del agua es constante y la probabilidad de que la materia orgánica se una al fruto es menor y por ello observamos que a mayor turbidez menor recuperación, debido a que los ooquistes se adhirieron a la materia orgánica. Estos resultados concuerdan con los reportados por Feng *et al.* (2003), quienes han estudiado el efecto de la turbidez en los ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, observando que a mayor turbidez menor capacidad de recuperación de los ooquistes.

Es importante, que en una tina de lavado de frutos de tomate no deben existir niveles de turbidez altos, debido a que se corre el riesgo que el desinfectante empleado

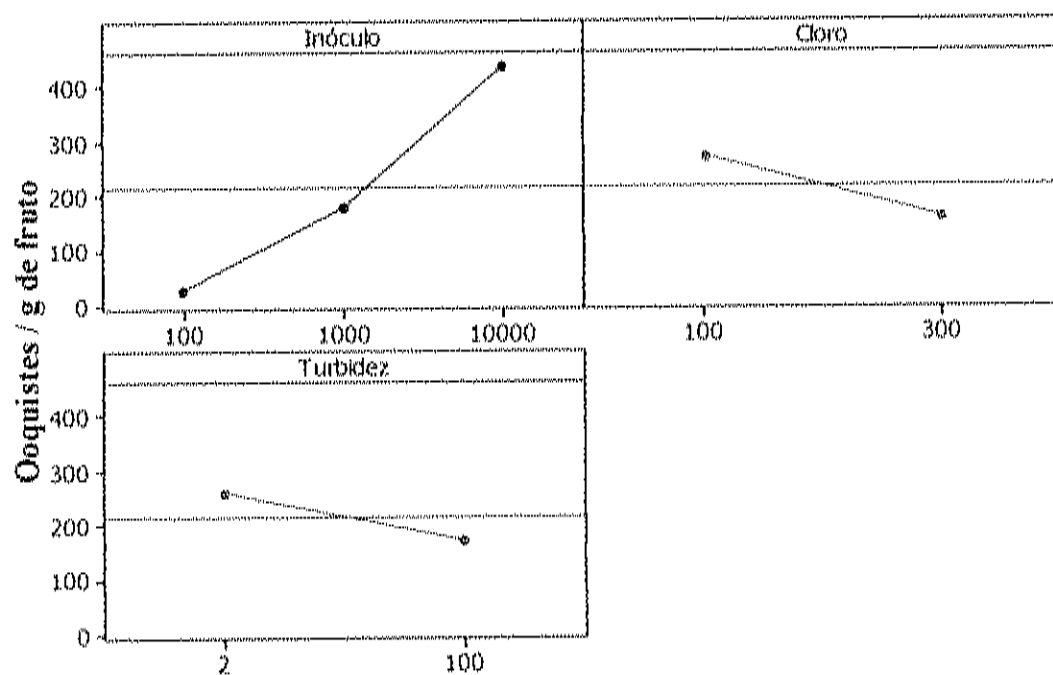
generalmente cloro, no lleve a cabo su efecto desinfectante, sobre los microorganismos patógenos potencialmente presentes en la tina. Por lo que es importante señalar, que los niveles de cloro empleados en las tinas no son suficientes para contrarrestar la presencia de protozoarios, y que la sola presencia de un ooquistes, pone en evidencia el riesgo potencial que representan los ooquistes al poderse adherir a la superficie de frutos que son lavados y desinfectados en dichas tina.

### Efectos Principales

El ANOVA muestra que la mayor variabilidad observada se debió al efecto del factor inóculo y la interacción inóculo – turbidez (Cuadro 10).

De acuerdo a la gráfica de efectos principales (Fig. 7), existe diferencia significativa entre los inóculos ( $p = 0.03$ ) donde se observa que existe diferencia significativa entre el inóculo 100 y 10000 pero no así con el inóculo de 1000, tampoco existe diferencia significativa entre el inóculo 1000 y 10000, sin embargo, se puede observar que a mayor inóculo de 10,000 ooquistes / L, se presenta mayor adherencia a la superficie de tomate, que a concentraciones menores de 1,000 ooquiste / L y 100 ooquistes / L. En cuanto a al factores cloro no se encontraron diferencias significativas, sin embargo, se puede observar en la Figura 7 que a una concentración de 100 ppm existe mayor adherencia de ooquistes de *Cryptosporidium* (250 ooquites / g de fruto),

mientras que a una concentración de 300 ppm la adherencia al fruto fue menor (100 ooquistes / g de fruto).



**Figura 7.** Efectos Principales: Inóculo, Cloro y Turbidez, Sobre la Presencia de Ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en Frutos de Tomate, Simulando Condiciones de Tinajas de Lavado.

El análisis del ANOVA (Cuadro 10), arroja que el factor turbidez tampoco tiene diferencia significativa, sin embargo, podemos observar (Fig. 7) que a una menor turbidez la adherencia de los ooquistes de *Cryptosporidium* al fruto de tomate fue mayor

que cuando la turbidez aumenta a 100 NTU, esto debido a la capacidad de recuperación del método empleado.

### Análisis de Varianza Simulación de Espreas

La tabla ANOVA de simulación en espreas (Cuadro 11) muestra que el factor inóculo fue el único que resulto significativo ( $p = 0.035$ ).

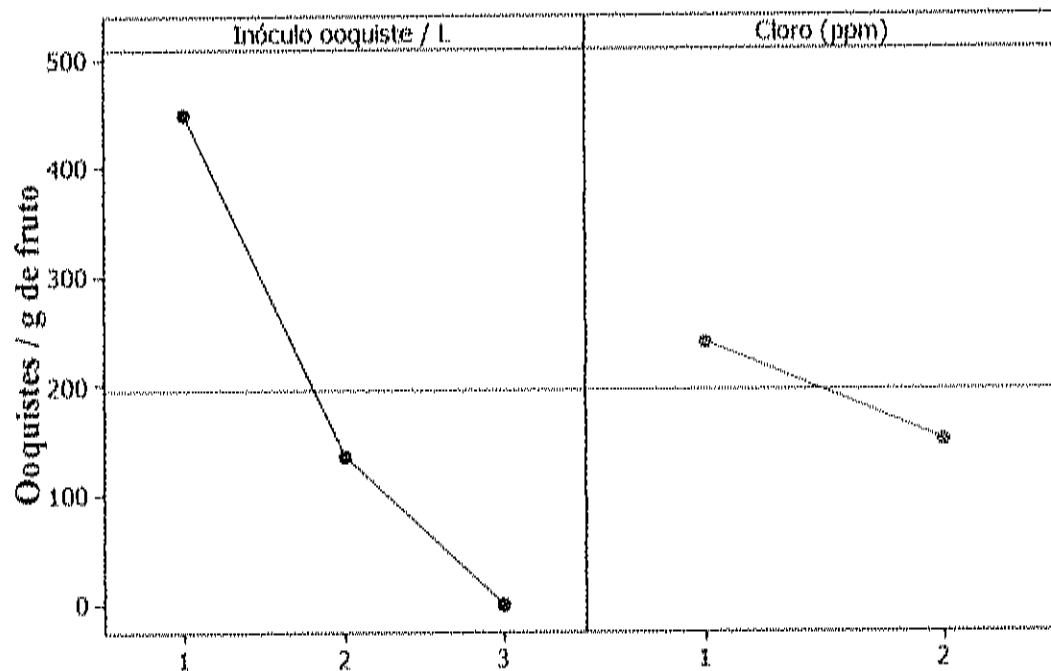
**Cuadro 11.** ANOVA de la Simulación de Espreas.

<b>Fuente</b>	<b>G.L.</b>	<b>Seq SS</b>	<b>Adj SS</b>	<b>Adj MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Inóculo</b>	2	106631	106631	53316	6,15	<b>0,035</b>
Cloro	1	5963	5963	5963	0,69	0,438
Inóculo*Cloro	2	12300	12300	6150	0,71	0,529
Error	6	51975	51975	8662		
Total	11	176870				

Las comparaciones de medias se realizaron mediante la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ); encontrando diferencias significativas en el factor inóculo.

### Efectos Principales

De acuerdo a la gráfica de efectos principales (Fig. 8), existe diferencia significativa entre el factor inóculo ( $p = 0.035$ ), observándose que a mayor concentración de inóculo, mayor probabilidad de que los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* queden adheridos en la superficie del fruto de tomate. Se puede observar que el inóculo de 100 ooquistes /L es significativamente diferente al inóculo 10000 ooquistes /L, sin embargo no existe diferencia significativa con el inóculo de 1000 ooquistes /L. Así mismo podemos observar que no existe diferencia significativa entre el inóculo de 1000 ooquistes /L con el inóculo 10000 ooquistes /L. En cuanto al factor cloro no se encontraron diferencias significativas.



**Figura 8.** Efectos Principales Sobre la Presencia de Ooquistes de *Cryptosporidium* en Frutos de Tomate, Simulando Condiciones de Espreas de Lavado.

Es de esperarse que a medida que se aumenta la contaminación en el agua, existe mayor riesgo de que los ooquistes queden adheridos a la superficie de los frutos. Sin embargo, la simulación de las espreas, pueden jugar un papel importante en dispersar los ooquistes, debido a la presión que estas pueden ejercer sobre la superficie de los frutos, ya que cuando la presión es mayor, puede suponerse que los ooquistes, los cuales son de pequeño tamaño (4-6  $\mu\text{m}$ ), se dispersen más rápidamente y se queden adheridos al frutos más fácilmente, que si la presión es menor, debido a que la fuerza necesaria para disparar los ooquistes será menor y por lo tanto menor será su presencia en el fruto.

## CONCLUSIONES

- ↳ De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos concluir que *Cryptosporidium* y *Giardia* están presentes en el agua superficial de uso agrícola del valle de Culiacán, Sinaloa en 48.3 % y 50 % de las muestras analizadas, respectivamente.
- ↳ Los resultados obtenidos de los tres empaques agrícolas analizados, indican la presencia de ambos protozoarios. Ooquistes de *Cryptosporidium* en un rango de 133.33 ooquistes / 100L, y quistes de *Giardia* en un rango de 116.71 – 600.60 quistes / 100 L.
- ↳ Los frutos evaluados del campo, así como los frutos empacados, resultaron negativos para ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*, mientras que aquellos que se encontraban en las tinas y espreas de lavado fueron positivos, encontrándose en un rango de 5,000 ooquistes de *Cryptosporidium* / g de tomate y 6006.6 quistes de *Giardia* / g de tomate respectivamente.
- ↳ Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, donde se simuló condiciones de tinas de lavado indican que los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* son capaces de adherirse a la superficie de tomate con bajos niveles de turbidez.
- ↳ Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, donde se simuló condiciones de espreas indican que a mayor concentración de ooquistes de



*Cryptosporidium parvum* mayor adherencia al fruto de tomate, sin importar las dosis de cloro analizadas.

## SUGERENCIAS

Es de vital importancia disminuir el riesgo de contaminación de frutas y hortalizas que tienen contacto con el agua, debido a que el agua superficial, juega un papel importante en la presencia de protozoarios sobre hortalizas que son regadas o lavadas con agua superficial contaminada. Para ello es necesario realizar monitoreos continuos sobre la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua de uso agrícola, así como en el agua de lavado y desinfección de hortalizas.

Es necesario que los empaques agrícolas monitoreen las concentraciones de ambos protozoarios en el agua de uso agrícola, así como en las tinajas de lavado de sus empaques, para que tomen en consideración nuevas estrategias que permitan reducir su presencia. De esta manera poder disminuir el riesgo que representa el que frutas y hortalizas que tienen contacto con el agua pueden contener ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*. Además, es necesario evaluar diferentes concentraciones de desinfectantes para eliminar a estos protozoarios, debido a su alta resistencia al cloro, comúnmente empleado en la desinfección de empaques agrícolas.

Además es necesario desarrollar investigaciones sobre la viabilidad de los ooquistes y quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia*, presentes en el ambiente. Para que dicha información sea utilizada en regularizar la presencia de ambos protozoarios en el agua de riego, así como en el agua de lavado de hortalizas.

Los resultados obtenidos, pueden servir de base para futuros estudios relacionados a establecer el riesgo microbiológico de las concentraciones encontradas en el agua de irrigación, así como las encontradas en la superficie

## LITERATURA CITADA

Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**:447-475.

American Public Health Association. American Water Works Association and Water Environmental Federation. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20<sup>th</sup> Ed.

Beuchat, LR. 1996. Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Produce. *Journal of Food Protection*. **59**: 204-216.

Bednarska M., Bajer A., Sinski E. 1998. Calves as a Potencial Reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* sp. *Annals of Agricultural and Environmental of Medicine*. **5**:135-138.

Bitton, G. 1994. Wastewater Microbiology Gainesville, Florida. wiley-Liss. 97 pp.

Bradford, S.A., Schijven, J. 2002. Release of *Cryptosporidium* and *Giardia* from Dairy Calf Manure: Impact of Solution Salinity. *Environmetal Science Technology*. **36**:3916-3923.

Brackett E.R. 1987. Microbiological Consequences of Minimally Processed Fruits and Vegetables. *Journal of Food Safety*. **10**:195-206.

Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. 2001. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Manual Moderno. 17ª ed. p. 699-724.

Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Aulicino, F.A., Pozio Edoardo. 2003. *Giardia* cysts in Wastewater Treatment Plants in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 3393-3398.

Candil Ruiz A., Uribe M., Diaz S. P., De León R., Naranjo J., Gerba C. P. 1990. Calidad Microbiológica del Agua de la Zona Centro de Sinaloa. *Sociedad Mexicana de Ingeniería Ambiental, A. C. Congreso Nacional*. Oaxaca. 25-26.

Campbell A.T., Wallis P. 2002. The Effect of UV Irradiation on Human-Derived *Giardia lamblia* Cyst. *Water Research*. **36**:963-969.

Center for Disease Control and Prevention 1999. Surface Decontamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw: A Review 1999. *Morbidity and Mortality Weekly Reviews*. **1**:43.

Centro de Estudios del Sector Privado para el Desarrollo Sustentable (CEPIS). 1998. Eficiencia y Uso Sustentable del Agua en México: Participación del Sector Privado. Publicación. Cuadernos de Trabajo. Consejo Coordinador Empresarial.

Chaidez, C. 2002. Inocuidad de Frutas y Hortalizas Frescas: Efectos del Agua Contaminada. *Agua Latinoamérica*. 2:36-39.

Chaidez C., Moreno M., Rubio W., Angulo M., Valdez B. 2003. Comparison of the Disinfection Efficacy of Chlorine-Based Products for Inactivation of Viral Indicators and Pathogenic Bacteria in Produce Wash Water. *International Journal of Environmental Health Research*. 13:295-302.

Chauret C.P., Radziminski C.Z., Lepuil M., Creason R., Andrews R.C. 2001. Chlorine Dioxide Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocyst and Bacterial Spore Indicators. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2993-3001.

Cifuentes, E., Gomez, M., Blumenthal, U., Tellez-Rojo, M.M., Romieu, I., Ruiz-Palacios, G. Ruiz-Velazco S. 2000. Risk Factors for *Giardia intestinalis* in Agricultural Villages Practicing Wastewater Irrigation in México. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 62: 388-392.

Comisión Nacional del Agua, 2003. Usos del Agua en la Infraestructura. <http://www.cna.gob.mx/>.

Craun, G.F., Castro, R. 1996. La Calidad del Agua Potable en América Latina. Ponderación de los Riesgos Microbiológicos Contra los Riesgos de los Subproductos de la Desinfección. Química. ILSI press, Washington, D.C. pp. 50-62.

Dai X., Boll J. 2003. Evaluation of Attachment of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to Soil Particles. *Journal of Environmental Quality*. **32**:296-304.

Díaz-Sobac, R., Vernon-Carter, J. 1999. Inocuidad Microbiológica de Frutas Frescas y Mínimamente Procesadas. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. **2**:133-136.

Díaz-Carbonell J.V., Fernández-Alonso B.M.E. 1996. Giardiasis: Una Breve Revisión. Perspectivas Diagnósticas en el Laboratorio Clínico. *Asociación Española de Pediatría*. **44**:87-91.

DiGiorgio, CL., González, DA. CC. Huitt. 2002. *Cryptosporidium* and *Giardia* Recoveries in Natural Waters by Using Environmental Protection Agency Method 1623. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**:5952-5955.

Environmental Protection Agency. 1995. ICR Protozoan Method for Detecting *Giardia* Cyst and *Cryptosporidium* Oocyst in Water by Fluorescent Antibody Procedure. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, D.C.

Environment Protection Agency. 2000. *Giardia*: Drinking Water Fact Sheet. *Office of Water*. Washington, D.C.

Food and Drug Administration (FDA). Center for Food Safety and Applied Nutrition. 1998. Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetable. <http://www.foodsafety.gov/~dms/prodguid.html>

Foster J.C., Glass M.D., Courtney P.D., Ward L.A. 2003. Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* Oocyst Viability. *Food Microbiology*, **20**: 351-357.

Feng Y.Y., Leong O.S., Young H.J., Song F.L., Lan T.X., Jern N.W. 2003. Effect of Particles on the Recovery of *Cryptosporidium* Oocysts from Source Water Samples of Various Turbidities. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**:1898-1903.

Fernandez E.E., Castillo A.A., Saldana L.J. 1989. Survival and Growth of *Salmonella* and *Shigella* on Sliced Fresh Fruits. *Journal of Food Protection*, **52**:471-472.



Finch G.R., Black E.K., Labatiuk C.W., Gyürék L., Belosevic M. 1993. Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* Cyst Inactivation by Ozone. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**:3674-3680.

Food and Drug Administration (FDA) 2001. Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-cut Produce. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Cáp II. <http://vm.cfsan.fda.gov/~comm/ift3-toc.html>.

Guidelines for Canadian Drinking Water Quality. 1996. Sixth Edition, Federal-Provincial Subcommittee on Drinking Water of the Federal-Provincial Committee on Environmental and Occupational Health. *Report of the Commission of Inquiry*. Health Canada: Ottawa,.

Harris L.J., Farver J.N., Beuchat L.R., Parish M.E., Suslow T.V., Garrett E.H. Busta F.F. 2003. Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2**:78-104.

Hass C.N., Rose J.B., Gerba C.P. 1999. Quantitative Microbial Risk Assessment. Wiley & Sons. 150 pp.- 310 pp.

Howe A.D., Forster S., Morton S., Marshall R., Osborn K. S., Wright P., Hunter P. R. 2002. *Cryptosporidium* Oocysts in a Water Supply Associated with a Cryptosporidiosis Outbreak. *Emerging Infectious Diseases*. **8**:619-624.

Ibañez H.O.F. 2002. Nuevos Estudios sobre Agua y Medio Ambiente en Juárez. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. 51 pp.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2004. <http://www.inegi.gob.mx/inegi/default.asp>.

Jellison K.L., Hemond H.F., Schauer D.B. 2002. Sources and Species of *Cryptosporidium* Oocysts in the Wachusett Reservoir Watershed. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**:569-575.

Johnson D.W., Pieniazek N.J., Griffin D.W., Misener L., Rose J. B. 1995. Development of a PCR Protocol for Sensitive Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Water Sample. *Applied and Environmental Microbiology*. **11**: 3849-3855.

Kniel K.E., Lindsay D.S., Summer S.S., Hackney C.R., Pierson M.D., Dubney J.P. 2002. Examination of Attachment and Survival of *Toxoplasma Gondii* Oocyst on Raspberries and Blueberries. *Journal of Parasitology*. **88**:790-793.

Kuczynska, E., Shelton, D.R. 1999. Method for Detection and Enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocyst in Feces, Manures, and Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**:2820-2826.

LEChevallier, M.W., Norton, W.D. Lee, R.G. 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Surface Water Supplies. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**:2610-2616.

LEChevallier, M.W., Norton, W.D., Siegel, J.E. Abbaszadegan, M. 1995. Procedure for Detection of *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* Oocyst in Water. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**:690-697.

Liyanage, L.R.J., Finch, G.R., Belosevic, M. 1997. Effect of Aqueous Chlorine and Oxychlorine Compounds on *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Environmental Science Technology*. **31**:1992-1994.

Linden K.G., Shin G.A.M., Faubert G., Cairns W., Sobsey M.D. 2002. UV Disinfection of *Giardia lamblia* Cyst in Water. *Environmental Science Technology*. **36**:2519-2522.

Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C. P. 2000. Environmental Microbiology. Academic Press A. *Harcourt Science and Technology*. 461 pp. 539 pp.

Medema, G.J., Schets, F.M., Teunis, P.F. M., Havelaar, A.H. 1998. Sedimentation of Free and Attached *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* cyst in Water. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**: 4460-4466.

Medema G. J. 1999. *Cryptosporidium* and *Giardia*: New Challenges to the Water Industry. Thesis Universiteit Utrecht. Whit ref: Whit summaries in English and Dutch. Subject headings: intestinal protozoo / drinking water / water treatment. ISBN 90 – 393 – 2120 – 5.

Monge R., Chinchilla M. Reyes L.1996. Estacionalidad de Parásitos y Bacterias Intestinales en Hortalizas que se Consumen Crudas en Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. **44**: 369-375.

McAnulty J.M., MBBS, MPH, Fleming D.W.M.D., Gonzalez A.H. 1994. A Community-wide Outbreak of Cryptosporidiosis Associated with Swimming at a Wave Pool. *Journal of American Medical Association*. **272**:1597-1600.

McDonnell G. Russell D. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**:147-179.

Nasser A.M., Huberman Z., Zilberman A., Greenfeld S. 2003. Die-off and Retardation of *Cryptosporidium* spp. Oocyst in Loamy Soil Saturated with Secondary Effluent. *Water Science and Technology:Water Supply*. 4:253-259.

Norma Oficial Mexicana: NOM-001-SEMARNAT-1996. Establece Límites Máximos Permisibles de Contaminantes en las Descargas de Aguas Residuales en Aguas y Bienes Nacionales. Diario Oficial, 6 de Enero, 1997.

Norma Oficial Mexicana: NOM-002-SEMARNAT-1996. Establece Límites Máximos Permisibles de Contaminantes en las Descargas de Aguas Residuales a los Sistemas de Alcantarillado Urbano o Municipal. Diario Oficial, 6 de Enero, 1997.

Norma Oficial Mexicana: NOM-003-SEMARNAT-1997. Establece Límites Máximos Permisibles de Contaminantes para las Aguas Residuales Tratadas que se Reusen en Servicio al Público. Diario Oficial, 6 de Enero, 1997.

Okafo C.N., Umoh V.J., Galdima M. 2003. Occurrence of Pathogens on Vegetables Harvested from Soils Irrigated with Contaminated Streams. *Science of the Total Environment*. 311:49-56.

Ong, C., Moorehead, W., Ross, A. y Isaac-Renton, J. 1996. Studies of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in Two Adjacent Watersheds. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**:2798-2805.

Ono K., Tsuji H., Kumar R.S., Yamamoto A., Masuda K., Endo T., Hotta H., Kawamura T., Uga S. 2001. Contamination of River Water by *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Western Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 3832-3836.

Organización Meteorológica Mundial/ Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y Cultura 1997. ¿Hay Suficiente Agua en el Mundo? OMM No. 857. ISBN 92-63-30857-8.

Organización Mundial de la Salud. 2000. Global Water Supply and Sanitation Assessment Geneva

[http://www.who.int/docstore/water\\_sanitation\\_health/Globassessment/Global1.htm#1.1](http://www.who.int/docstore/water_sanitation_health/Globassessment/Global1.htm#1.1)

Pratdesaba R.A., González M., Piedrasanta E., Mérida C., Contreras K., Vela C., Culajay F., Flores L., Torres O. 2001. *Cyclospora cayentanensis* in Three Populations at Risk in Guatemala. *Journal of Clinical Microbiology*. **39**:2951-2953.

Quintero-Betancourt, W. Botero de Ledesma L. 2000. Descriptive Study on the Presence of Protozoan Cysts and Bacterial Indicators in a Drinking Water Treatment

Plant in Maracaibo, Venezuela. *International Journal of Environmental Health Research*. **10**:51-61.

Rose, J.B., Landeen, L.K., Riley, K.R., Gerba, C.P. 1989. Evaluation of Immunofluorescence Techniques for Detection of *Cryptosporidium* Oocyst and *Giardia* Cyst from Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**:3189-3196.

Rose, J.B., Gerba, C.P. Jakubowski, W. 1991. Survey of Potable Water Supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Environmental Science Technology*. **25**:1393-1340.

Rose J.B., Shifko T.R. 1999. *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and Their Impact on Foods: A Review. *Journal of Food Protection*. **62**:1059-1070.

Rose J.B., Huffman D.E., Gennaccaro A. 2002. Risk and Control of Waterborne Cryptosporidiosis. *FEMS Microbiology Reviews*. **26**:113-123.

Roubin, M.R., Pharamond, J.S., Zanelli, F., Poty, F., Houdart, S., Laurent, F., Drocourt, J.L., Poucke, V. 2002. Application of Laser Scanning Cytometry Followed by Epifluorescent and Differential Interference Contrast Microscopy for the Detection and Enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Raw and Potable Waters. *Journal of Applied Microbiology*. **93**:599-607.

Sánchez R. J. 2002. Origen Infeccioso de *Cryptosporidium parvum*. *Revista Mexicana de Puericultura y Pediatría*. **9**:146-151.

Shepherd, KM. Wyn-Jones AP.1996. An Evaluation of Methods for Simultaneous Detection of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts from Water. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**:1371-1322.

Siller, C.J. Báez S.M., Sañudo B.A. Báez S.R. 2002. Manual de Buenas Prácticas Agrícolas. Guías para el Agricultor. Unidad de Inocuidad de los Alimentos.

Simmons O.D., Sobsey M.D., Heaney C.D., Schaefer F.W., Francy D.S. 2001. Concentration and Detection of *Cryptosporidium* Oocyst in Surface Water Samples by Method 1622 Using Ultrafiltration and Capsule Filtration. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**:1123-1127.

Solomon E.B., Yaron S., Matthews K.R. 2002. Transmisión of *Escherichia coli* O157:H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant Tissue and Its Subsequent Internalization. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**:397-400.

Sturbaum G.D., Ortega Y.R., Gilman R.H., Sterling C.R. Cabrera L., Klein D.A. 1998. Detection of *Cyclospora cayentanensis* in Wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**:2284-2286.



Tay Z. J. 1994. Microbiología y Parasitología Médica. Segunda edición. Ed. Méndez. Cáp. 3.40-3.45.

Teunis P. F. M., Medema G. J., Kruidenier L., Havelaar A. H. 1997. Assessment of the Risk of Infection by *Cryptosporidium* or *Giardia* in Drinking Water from a Surface Water Source. *Water Resource*. 31:1333-1346.

Thurston-Enriquez J.A., Watt P., Dowd S.E., Enriquez R., Pepper I.L., Gerba C.P. 2002. Detection of Protozoan Parasites and Microsporidia in Irrigation Waters Used for Crop Production. *Journal of Food Protection*. 65:378-382.

Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2001. Microbiology an Introduction. Addison Wesley Longman. 7 ed. 706 pp.

Tyrrel S.F., Quinton J.N. 2003. Overland Flow Transport of Pathogens from Agricultural Land Receiving Faecal Wastes. *Journal of Applied Microbiology*. 94:87S-93S.

Vásquez-Arroyo J., Cabral-Martell A. 2001. La Inocuidad Alimentaria, Realidad y Reto Mundial. *Fna/ana* 28: 4-13.

Walker, R.F. Stedinger, J.R. 1999. Fate and Transport Model of *Cryptosporidium*. *Journal of Environmental Engineering*. 125:325-333.

Weir, S.C., Pokorny, N.J., Carreno, R.A., Trevors, J.T., Lee, H. 2002. Efficacy of Common Laboratory Disinfectants on the Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocyst in Cell Culture. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 2576-2579.

## ANEXOS

Características del suelo empleado para simular condiciones de turbidez

<b>Análisis</b>	<b>Nivel de referencia</b>	<b>Resultado</b>
pH (25°C)	6-8	7.38
Conductividad eléctrica (ds/m)	1-2	0.39
Materia Orgánica (%)	1.5	2.07
Nitrógeno N-NO <sub>3</sub> (ppm)	30	4.0
Fósforo P-PO <sub>4</sub> (ppm)	20	38.5
Sodio (ppm)	250	117.038
Potasio (ppm)	180	403.534
Calcio (ppm)	2000	5194
Magnesio (ppm)	250	1936.29
Fierro (ppm)	5.0	49.03
Manganeso (ppm)	-	177.66
Cinc (ppm)	1.5	3.39
Cobre (ppm)	8.0	2.27
CIC (me/100g)	35.0	43.65
Textura	-	Arcillosa
Arcilla (%)	-	46.48
Limo (%)	-	27.28
Arena (%)	-	26.24