

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS



**VALIDACION METODO DE FILTRACION PARA LA DETECCION DE
PROTOZOARIOS Y HELMINTOS EN MUESTRAS DE HORTALIZAS.**

PRESENTADO POR

ANTONIO VASQUEZ HIDALGO

PARA OPTAR AL GRADO DE

MAESTRO EN MICROBIOLOGIA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS

JULIO DE 2011

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIA:

MSc. MORENA LIZETTE MARTINEZ DE DIAZ

COMITÉ DE TESIS

MSc Rafael Antonio Cedillos

Miembro Docente Director

MSc Gilberto Ascencio Aleman

Miembro Docente Director

MSc Andres Wilfredo Rivas

Miembro Comité de Tesis

MSc Oscar Guzman Julian

Miembro Comité de Tesis

MSc Francisco Leopoldo Merino Cisneros

Miembro Comité de Tesis

COORDINACION DEL PROGRAMA

MSc Coralía de los Angeles Gonzalez

Coordinadora Maestría

MSc María Evelyn Sanchez de Ramos

Coordinadora Maestría

Dr. Antonio Vásquez Hidalgo

Estudiante

Fecha de entrega: Julio 2011

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**Validación Método de Filtración para la detección de protozoarios y
helminos en muestras de hortalizas.**

**Tesis sometida a consideración del comité Académico y de Tesis del
programa de Posgrado en Maestría en Microbiología e Inocuidad de
Alimentos, para optar al grado de:**

MAESTRO EN MICROBIOLOGIA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS

PRESENTADO POR

ANTONIO VASQUEZ HIDALGO

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, C.A.

Agradecimientos

A Dios: Por su fortaleza

A mis padres: por su apoyo incondicional

- **Prof. María Aura Hidalgo**
- **Tec. en Ing Manuel Antonio Vásquez**

A mis hijos: por su paciencia y cariño.

- **Allen Josué**
- **Lilian Ivette**
- **Astrid Marié**

A mis Amigos y Compañeros: por su comprensión y estima.

A mis profesores de la maestría: por su apoyo académico.

A mis microorganismos: que son la existencia de mis investigaciones.

A profesores asesores directores: Por su apoyo académico e investigativo

- **MSc Rafael Antonio Cedillos**
- **MSc Gilberto Ascencio Alemán**

A profesores y colaboradores de Maestría: por su comprensión y fortaleza

MSc Coralía de los Ángeles González
MSc María Evelyn Sánchez de Ramos
MSc Andrés Wilfredo Rivas
MSc Francisco Leopoldo Merino
MSc Oscar Guzmán Julián
MSc Ligia Salazar Banegas

MSc María Torres Vitela
MSc Ramón Elías Mejía
MSc Amy Elieth Moran
MSc Vianney de Abrego
MSc Sandra Luz Ruiz
MSc Rogelio Morales Borges

†

A mis compañeros de apoyo técnico:

Lic Omar Aguilar
Br. Juan José Rivas
Br. Zoila Giròn
Br. Margarita Pérez

INDICE

	Pag No
Resumen	
Capítulo I Introducción.	xiii
Capítulo II Objetivos	17
Capítulo III Marco teórico.	19
3.1 Examen de Laboratorio	
3.2 Morfología de protozoarios y helmintos.	
3.3 Metodología de Validación	
3.4 Documentación	
3.5 Protocolo de validación	
3.6 Informe Técnico	
3.7 Evaluación	
Capítulo IV Diseño metodológico.	36
4.1 Tipo de estudio	
4.2 Fase experimental y de campo	
4.3 Métodos de laboratorio de Filtración y de Ritchie	
4.4 Estandarización del método de filtración.	
4.5 Validación del método de filtración versus método de Ritchie	
4.5.1 Documentación Procedimiento y Validación de métodos microbiológico cualitativos. Adecuabilidad, Selectividad, Sensibilidad y especificidad, Valor predictivo de prueba positiva y negativa, Confiabilidad diagnóstica, Límite de detección.	
4.5.2 Criterios de evaluación según guía de validación de métodos cuantitativos microbiológicos por la AOAC.	

(Asociación Oficial de Químicos Analistas). Exactitud, Precisión, Repetitividad, Reproducibilidad, Limite de cuantificación, Linealidad, Robustez,	
4.5 Preparación del inóculo.	
4.6 Análisis de los datos.	
Capítulo V Resultados y discusión	61
5.1 Método análisis cuantitativo	
5.2 Método análisis cualitativo	
Capítulo VI Documentos de validación	88
Capítulo VII Conclusiones	112
Capítulo VIII Recomendaciones	115
Bibliografía	118
Glosario	123
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

Figura No		Pag No
1	Diámetro de los principales parásitos intestinales del humano	146
2	Consolidado validación método en protozoarios y helmintos por filtración en muestras crudas de hortalizas, provenientes de los mercados municipales A,B,C de San Salvador	154
3	Algoritmo para el examen parasitologico.	156
4	Secuencia del método de filtración	159
5	Ejemplo de calculadora bioestadística para estudios experimentales.	161
6	p-Value Calculator for the student t-test	162
7	Filtro marca Ahlstrom	163
8	Filtración al vacío y por gravedad	164
9	Hoja de cotejo cualitativo y cuantitativo	165
10	Tabla de ANOVA y tablas de contingencia 2x2	168

INDICE DE FIGURAS

Anexo No		Pag No
1	Diagrama de flujo para la validación de ensayos cualitativos.	31
2	Cilantro y lechuga.	41
3	Concentración 10,20,30,40,50 de parásitos por los métodos de filtración y Ritchie.	76
4	Parásitos intestinales más frecuentes del humano vistos en muestras crudas de hortalizas por el método de filtración.	143
5	Clave para identificar huevos de helmintos	147
6	Tamaños relativos de los huevos de helmintos	148
7	Clave para identificar trofozoitos amebianos en preparaciones teñidas.	149
8	Clave para identificar quistes de amebas y flagelados	150
9	Clave para identificación de protozoarios Amebas, flagelados y helmintos.	151
10	Estadio de helmintos intestinales	152
11	Clave para identificar quistes flagelados intestinales	153
12	Calibración del microscopio con ocular micrométrico	158
13	Método de filtración	166
14	Método de Ritchie	167

INDICE DE TABLAS

Tabla No		Pag No
1	Parámetros de validación para tipo de prueba microbiológica cuantitativa y cualitativa.	32
2	Datos requeridos para validación	33
3	Hoja de cotejo No 1. Recuperabilidad método de filtración en muestras inoculadas con 10 parásitos intestinales en filtros de 2 micras en 30 ml agua destilada. Análisis cuantitativo. n=100	62
4	Hoja de cotejo No 2. Recuperabilidad método de filtración en muestras inoculadas con 10 parásitos intestinales en filtros de 2 micras en 30 ml agua destilada. Análisis cuantitativo. Método Referencia (Ritchie). n=100	63
5	Hoja de cotejo No 3. Recuperabilidad método de filtración en muestras naturales inoculadas con 10 parásitos intestinales en filtros de 2 micras en 30 ml agua destilada. Análisis cuantitativo. n=40	65
6	Porcentaje de recuperación de muestras inoculadas	65
7	Total inculo en Método de filtración y Ritchie en muestras inoculadas usando filtros de 2 micras con 10 parásitos/ml en 100 muestras por inculo. Análisis cuantitativo.	65
8	Recuperabilidad método de filtración y Ritchie en muestras inoculadas con 10 parásitos. Análisis cuantitativo. n=100	66
9	Resultado de ensayo para determinar limite de cuantificación del método por filtración.	67
10	Resultado ensayo para repetibilidad entre métodos en 10 repeticiones.	68
11	T-student. Resultados del ensayo para exactitud del método de filtración y Ritchie en muestras naturales.	69
12	Pruebas de sensibilidad y especificidad para muestras positivas en muestras inoculadas de parásitos en muestra	72

	de referencia.	
13	Resultado pruebas positivas en los métodos Ritchie y filtración para muestras inoculadas con parásitos y muestras naturales en los mercados A,B,C. N=80	73
14	Frecuencia Comparación método Referencia y filtración en muestras inoculadas de parásitos de Cilantro y lechuga. n 40	74
15	Prueba de precisión del método de filtración en filtros de 2,6 y 10 micras en 5 repeticiones.	77
16	ANOVA para análisis de varianza.	79
17	Resultado de muestras de análisis por los métodos Ritchie y validación de muestras crudas de hortalizas.	80
18	Resultado método cualitativo de validación por filtración en muestras inoculadas.	81
19	Hoja de cotejo. Método de filtración al vacío en muestras naturales inoculadas con parásitos intestinales en filtro de 2 micras en 10 ml de agua destilada. Análisis Cualitativo.	83
20	Resumen resultado de validación del método de filtración por método cuantitativo y método cualitativo.	84
21	Resumen ventajas y desventajas al utilizar el método de filtración al vacío y el método de Ritchie	86
22	Diccionario parasitologico.	168

RESUMEN

El trabajo de investigación se fundamentó en el desarrollo y validación de un método de filtración para diagnosticar y cuantificar parásitos en muestras de hortalizas y muestras contaminadas versus método de Ritchie (Referencia). El estudio se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, Laboratorios de Microbiología e inocuidad de alimentos y laboratorio de la Facultad de Medicina.

Objetivo. Desarrollar y Validar método de filtración para el diagnóstico y recuento de huevos de helmintos y quistes de protozoarios en muestras crudas de hortalizas y muestras inoculadas artificialmente.

Metodología. Se utilizó la guía de validación de métodos microbiológicos cualitativos y cuantitativos de la ASOCIACION OFICIAL DE QUIMICOS ANALISTAS. DE LA NORMA ISO 16140 (2002) y La AOAC INTERNATIONAL (1999), Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation,

Resultados: De los resultados obtenidos sometidos a los parámetros de validación cualitativa y cuantitativa se comprueba que el método de filtración da resultados satisfactorios que difiere significativamente con el método de Ritchie.

Conclusión: El método de filtración es más efectivo que el método de Ritchie. Por análisis cuantitativo se recupero mayor cantidad de parásitos por filtración, por análisis estadístico se encontró diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos. Por análisis cualitativo ambos métodos identificaron formas parasitarias.

CAPITULO I
1. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

Se procedió a desarrollar un método de filtración cualitativo y cuantitativo a partir de la inoculación de 1 ml de pool de parásitos en muestras contaminadas y naturales para determinar porcentaje de recuperación, luego en validar el método usando normas ISSO 1999.

La investigación se realizó en tres mercados de los distritos 1 y 2 denominados A, B, C correspondiente en su orden Tiendona, Central y San Miguelito.

Entre los aportes inmediatos de la investigación fue la de tener un método a bajo costo y útil, para determinar recuento parasitario intestinal provenientes de heces humanas y hortalizas contaminadas, a una concentración y detección de parásitos que no pueden lograrse con otros métodos en inocuidad de alimentos.

El parasitismo intestinal según registros del Ministerio de Salud, reportan que ocupa los primeros lugares con una alta prevalencia de morbilidad.¹ El aporte principal es que se desarrolló un método de laboratorio por filtración, para obtener con pequeñas concentraciones del inoculo en las hortalizas la identificación de parásitos de humanos, que a su vez ponen en riesgo la salud humana al consumir estos alimentos en posibles malas condiciones higiénicas.

No hay estudios que refieran al uso de filtración en hortalizas para la investigación de parásitos. Por lo que la investigación da un aporte nuevo a la tecnología. Actualmente existen otras técnicas y métodos para el estudio de los parásitos en heces humanas pero no para hortalizas.

¹ Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. El Salvador. Boletín 2005

Entre las limitaciones de la investigación se encontró que la identificación de trofozoitos en las muestras es bajo, esto debido a las condiciones ambientales en que se encuentran, una de ellas es el tiempo fuera del intestino se destruyen en promedio a las dos horas en heces frescas, ya que prevalecen mas las formas quísticas y larvas por las condiciones del medio ambiente son mas resistentes a la temperatura.

El consumo de hortalizas es una necesidad inherente del ser humano, que son fuente de minerales, vitaminas, fibra entre otros, mas sin embargo por sus características físicas, algunos de estos productos están expuestos a contaminantes microbiológicos y químicos, generando un riesgo para la salud humana.

La principal fuente de contaminación de las hortalizas es por las malas prácticas agrícolas en el uso de agua contaminada, tierras fertilizadas con abonos agrícolas y manipulación de los alimentos, que muchas veces proceden de aguas negras contaminadas con heces humanas y animales así como de parásitos intestinales en el manipulador de alimentos. Es importante desarrollar y validar el método de filtración porque no hay estudios validados con este método ya que no es común para detectar la presencia de parásitos intestinales en hortalizas.

Surge de la necesidad de hacer análisis previos de hortalizas que están a la venta del consumidor para prevenir enfermedades parasitarias e infectocontagiosas, que contribuyen de alguna manera en aumentar los índices morbilidad en los indicadores de salud de los establecimientos del nivel de atención I y II del Ministerio de Salud.

Entre las hipótesis de investigación, están:

Hipótesis Experimental: El método de filtración con filtros menores a 2 micras es mejor o igual de efectivo para detectar parásitos en muestras inoculadas y naturales de hortalizas que el método de Ritchie.

Hipótesis nula: El método de filtración con filtros menores a 2 micras no es mejor o igual de efectivo para detectar parásitos en muestras inoculadas y naturales de hortalizas que el método de Ritchie.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

Desarrollar y Validar método de Filtración para la detección de huevos de helmintos y quistes de protozoarios en muestras crudas de hortalizas.

2.2 Objetivos específicos:

1. Desarrollar y estandarizar método de filtración para detectar huevos de helmintos y quistes de protozoarios en muestras inoculadas y hortalizas contaminadas experimentalmente en el laboratorio.
2. Validar método de filtración con el método de Ritchie para detectar huevos de helmintos y quistes de protozoarios en muestras inoculadas y naturales de hortalizas obtenidas de mercados públicos de San Salvador.
3. Identificar diferentes formas parasitarias analizadas por los métodos cualitativo y cuantitativo.

TITULO III
MARCO TEORICO

3. MARCO TEORICO

3.1 Exámenes de laboratorio.

Para el estudio de las heces del ser humano, se utilizan en general los siguientes métodos o técnicas de laboratorio, como son: Examen general de Heces, Examen coprológico y exámenes especializados como son los métodos de concentración y flotación. En nuestro medio el más utilizado es el examen general de heces. **(1)**

El examen general de heces consta de un examen macroscópico y un examen microscópico. El examen macroscópico consiste en la observación de las características generales de las heces, como son: consistencia, cantidad, color, presencia de moco o sangre y presencia de helmintos adultos. La cantidad evacuada de heces se considera como es el volumen de materia fecal en 24 horas que puede variar de 100 a 500 g; la consistencia determina la apariencia de las heces que pueden ser duras, pastosas, blandas o líquidas, el color se debe al pigmento biliar; el olor se debe a la presencia del indol y escatol; la presencia de mucus se debe inflamación del intestino; los restos alimenticios indica que la persona no mastica adecuadamente; el pH nos indica que las heces tiene pH ácido. **(2)**

El examen microscópico permite la visualización de quistes, huevos y larvas de protozoarios y helmintos en 1 g de heces, que pueden existir miles de quistes o huevos. En general está compuesto de examen directo al fresco, el más utilizado pero tiene inconvenientes que no salen siempre positivas las muestras.

Existen otros métodos como el de concentración de heces que no se utilizan frecuentemente en laboratorios públicos o privados por el tiempo de preparación, pero que son más efectivos que un examen general de heces. (3)

También existen otros métodos denominados cuantitativos, se describen haciendo el recuento de huevos en las heces, el más utilizado es el Kato Katz.

Entre los métodos cualitativos, se diferencia del anterior en que se demuestra la presencia del helminto sin cuantificarla, en que muchas veces es necesario concentrar la muestra por la escasez de los parásitos, los métodos más frecuentes son: Sedimentación espontánea como Método de Hoffmann; Sedimentación por centrifugación como Método de Ritchie; Por Flotación como método de Faust, o Sheater. (3)

Entre los exámenes más especializados están: El examen coprológico que estudia características físicas, químicas, bacteriológicas y parasitológicas de las heces. Entre los principales protozoos a identificar por algún método, tenemos: ***Entamoeba histolytica***, ***Giardia lamblia***, ***Isospora belli***, ***Balantidium coli***, entre los comensales están: ***Entamoeba coli***, ***Endolimax nana***, ***Iodamoeba butschlii***, ***Chilomastix mesnili***, ***Blastocystis hominis*** y entre los helmintos están: ***Ascaris lumbricoides***, ***Hymenolepis nana***, ***Hymenolepis diminuta***, ***Trichuris trichiura***. (4,5,6,7).

Al momento no hay estudios que validen métodos de detección de parásitos en hortalizas, sino que han sido adaptados para el diagnóstico parasitológico, entre ellos: Sheater, Willis y Ritchie.

Entre los estudios que reportan el uso de estos métodos están: En Venezuela muchas de las enfermedades de transmisión alimentaria, incluidos bacterias, virus, hongos, parásitos, productos químicos y toxinas se registran en el estado de Aragua Venezuela, en que las parasitosis son un problema de Salud Pública. En este estudio se hizo análisis microbiológico determinando quistes de ***Entamoeba histolytica*** y huevos de ***Ascaris lumbricoides*** por el método directo. (8)

En la ciudad de Bolívar de Venezuela reportan presencia de parásitos humanos en alimentos como ***Blastocystis hominis***, ***Strongyloides stercoralis***, coccidios intestinales por el método de Ritchie, aplicado a lechugas provenientes de supermercados. (9)

En Costa Rica en un estudio en hortalizas de repollo, tomate, lechuga, pepino, zanahoria, rábano, cilantro encontraron parasitosis de ***E. coli*** y **coliformes fecales**, por el método Ritchie. (10)

En los mercados de la Paz, Bolivia procedentes de hortalizas comercializadas en los mercados de cebolla, acelga y berro presentaron parásitos comensales, ***E. nana***, ***E. coli***, ***Giardia sp***, ***Strongyloides sp***, ***Hymenolepis nana***, ***Fasciola hepática***, por el método de Sheater. (11)

En un estudio de contaminación enteroparasitaria de lechugas en mercados del estado de Lara, se encontró ***Entamoeba histolytica***, ***Entamoeba coli***, ***Toxoplasma gondii***, ***Toxocara sp***, por la técnica de Alvarez. (12)

La detección de parásitos en frutas y hortalizas en los mercados públicos y privados de la ciudad de Bogotá, encontraron enfermedades transmitidas por alimentos contaminados por el método Ritchie. (13)

En los mercados populares del municipio de Maracaibo, encontraron presencia de enteroparásitos en lechugas a ***Strongyloides sp, Ascaris sp*** por el método de sedimentación espontánea. (13).

En Argentina determinaron la presencia de parásitos intestinales en hortalizas, en lechuga, escarola, achicoria por el método directo y flotación Willis. (14)

Un estudio en San Salvador, encontraron en el mercado central en muestras de repollo y lechuga huevos de ***Toxocara sp, Ascaris lumbricoides y Strongyloides stercoralis*** usando el método de concentración por formol éter (Ritchie) y método de centrifugación. (15)

En la investigación se utilizó como método la filtración al vacío. No hay estudios que respalden o validen la implementación del método anterior, por lo que sería de mucha utilidad hacer uso del método como diagnóstico de parásitos en muestras de hortalizas.

Los métodos de filtración actuales se han utilizado para filtración de aguas pero no para diagnosticar parásitos en hortalizas. En general se dividen en dos: filtración por gravedad, que consiste en dejar pasar un líquido-sólido en una membrana de celulosa o filtro de papel y el otro por filtración al vacío que tienden a pasar por un filtro de membrana.

Se descarta el líquido de fondo y se utiliza la separación sólida o se realiza a través de un embudo de vidrio provisto de un filtro de papel, cónico o de pliegues, pasando el líquido por efecto de la gravedad, quedando la parte sólida retenida en el filtro en la superficie del filtro; el otro es por filtración al vacío, que consiste en separar mezclas heterogéneas entre un líquido y sólido, por medio de un papel filtro en donde el sólido queda en superficie del filtro y el líquido pasa en un recipiente colocado abajo, por medio de una bomba al vacío que succiona el líquido.

3.2. Morfología de los protozoarios y helmintos. (16,17,4,2)

Cada parásito tiene una morfología y característica propia que los diferencia de otros. El método es adecuado para todos los parásitos ya que nos los deforma y se identifican con toda normalidad sus aspectos morfológicos en cada especie en particular.

Entre los parásitos más frecuentemente reportados en las hortalizas, están:

Ascaris lumbricoides: El huevo no fecundado es elíptico grande mide de 50 a 90 micras de largo por 40 a 60 micras de ancho, las envolturas no se pueden distinguir con facilidad, la externa es parda y la interna es muy delgada, cubierta gruesa con granulaciones voluminosas y redondos que son refringentes con la luz. El huevo fértil de 70 micras de forma oval o redonda, envoltura externa es café, tiene cubierta mamelonada con membrana interna lisa, gruesa e incolora, con envoltura doble, con larva en su interior. El color es pardo o café, el

contenido de los huevos es incoloro o amarillo, su contenido es redondo y granuloso.

Balantidium coli: Trofozoíto tiene forma ovoide, con cilios cortos en su periferia, mide aproximadamente 50 a 200 micras de largo por 40-70 de ancho. Posee 2 núcleos denominados macronúcleo y micronúcleo. Es el más grande de todos. Quiste es voluminoso de 50 a 70 micras, forma redonda, envoltura delgada con pared doble, tiene un núcleo voluminoso y un núcleo pequeño, citoplasma granuloso, con muchos cuerpos de inclusión.

Chilomastix mesnili: Su quiste es en forma de pera o limón, mide aproximadamente 7 a 13 micras de largo por 4 a 8 micras de ancho. Trofozoito piriforme, mide 10 a 24 micras por 10 a 15 micras de ancho. Tiene tres flagelos.

Endolimax nana: forma quística es elíptica, que mide aproximadamente de 5 a 10 micras, tiene cuatro núcleos, cariosoma irregular, no tiene cromatina.

Entamoeba coli: Su quiste mide de 20 a 30 micras, forma oval o alargada e irregular, el quiste maduro tiene uno a ocho núcleos, cariosoma excéntrico, membrana engrosada, cariosoma voluminoso, citoplasma amarillo, vacuola voluminosa, cuerpos cromatoidales, es más grande que la *histolytica*. El trofozoito mide 20 a 40 micras, forma oval o alargada, cuerpos de inclusión numerosos, contiene núcleo visible, membrana irregular y granulosa.

Entamoeba histolytica: Tiene dos formas: Forma Trofozoito mide 10 a 20 micras, con núcleo excéntrico, cariosoma central, con citoplasma granular no vacuolado, contiene glóbulos rojos. Poseen pseudopodos, así como ectoplasma

transparente y endoplasma. La forma Quística mide 10 a 20 micras, redondo con barras cromatoidales, el quiste maduro tiene uno a cuatro núcleos sin vacuolas ni barras cromatoidales.

Giardia lamblia: Quiste con cuatro núcleos mide de 8 a 14 micras de largo y 7 a 10 micras de ancho, el trofozoito forma piriforme mide de 10 a 20 micras de largo por 5 a 10 de ancho, con dos núcleos, tiene seis flagelos, disco suctorio central con axostilo medial.

Hymenolepis diminuta: Huevos esféricos con doble cubierta, color café, mide de 60 a 80 micras, redonda, de color transparente o amarillo, envoltura gruesa, la externa es delgada y la interna es muy gruesa, contiene un embrión redondo.

Hymenolepis nana: Huevo forma oval con doble cubierta, mide de 40 a 45 micras, internamente tiene tres pares de ganchos, tiene filamentos polares entre membrana interna y externa en numero de 8 a 9 filamentos, la envoltura es doble, la membrana externa es delgada y la interna es gruesa, contiene una masa redonda o embrión con seis pares de ganchos, contiene gránulos.

Iodamoeba butschlii: Su forma quística mide de 5 a 12 micras, forma redonda u oval, la membrana no es visible. Tiene núcleo con cariosoma central grande, tiene una gran vacuola voluminosa de glucogeno.

Strongyloides stercoralis: mide 50 micras, contiene una larva gruesa, forma oval, envoltura delgada.

Taenia sp.: El huevo mide de 26 a 30 micras de largo por 30 a 40 micras de ancho, forma redonda, envoltura gruesa y lisa, contiene masa granulosa, de pared gruesa, centro radiado, en su interior hay un embrión hexacanto.

Trichuris trichiura: Huevo de color café, en forma elipsoidal o de barril o balón americano, con prominencias polares conteniendo tapones redondos y transparentes mucosos en los extremos, miden de 50 a 25 micras, cubierta externa gruesa y lisa, contiene una masa granulosa uniforme.

Uncinaria: huevo ovalado u elipsoide, mide 70 micras, con cubierta delgada y transparente en su interior, con menos de ocho a cuatro blastomeras.

3.3 Metodología de Validación. (18,19,20,21,22,23,24,25)

En el área experimental, los tipos de validación, se dividen básicamente en: Validación concurrente: aplicable a cambios del método, pero que no han sido validados normalmente como es el caso en la metodología a validar de un método o una técnica. Validación prospectiva: estudio que intenta demostrar y establecer un proceso debidamente documentada basado en un protocolo planificado establecer una evidencia.

El término validar significa comprobar por medio de un método o pruebas para tal fin, así por ejemplo el significado de validación según autores, significa: Validación primaria (ISO 9000:2000) "confirmación mediante el aporte de pruebas objetivas, de que se han cumplido los requisitos para el uso pretendido o una aplicación específica. Validación secundaria (ISO 9000:2000) demostración por experimento que un método establecido funciona de acuerdo con las especificaciones. Validación de un método alternativo (AOAC) es la

validación de un método de análisis que demuestra o estima un analito, como lo hace su correspondiente método de referencia. (26)

3.3.1 Características analíticas típicas usadas en métodos de validación cuantitativos y cualitativos.

Según la FAO (1997), en un reporte sobre la validación de métodos analíticos para el control de alimentos Un método validado ideal es aquel que ha progresado completamente a través de un estudio colaborativo, de acuerdo con los protocolos internacionales armonizados para el diseño, conducción e interpretación del funcionamiento de los métodos estudiados.

Para lo anterior se requiere que otros analistas se involucren en el diseño y compararlo con otros ya probados o estandarizados, como muestra de referencia para establecer diferencias estadísticamente significativas, con el objetivo de rechazar o aceptar el nuevo método. El parámetro de repetitividad permite reporte de datos validos o inequívocos que aceptarán o rechazarán el método en particular.

La diferencia entre el análisis cuantitativo y el análisis cualitativo radica fundamentalmente en expresar el resultado Es decir que el análisis cuantitativo se caracteriza por dos valores numéricos, el primero es la estimación del valor verdadero y el segundo corresponde a la incertidumbre asociada a la dispersión de los datos se encuentra el valor verdadero. En el caso de análisis cualitativo se caracteriza por dos valores, el primero con respuestas SI/NO o presencia/ausencia de un determinado analito en una muestra por encima de un determinado nivel de concentración y el segundo es la probabilidad de error asociada a una decisión tomada.

En general entre los parámetros de calidad en análisis cuantitativo, tenemos: sensibilidad, especificidad, selectividad, límite de cuantificación, rango y linealidad, incertidumbre, exactitud, precisión, robustez. Entre los parámetros de calidad en análisis cualitativo, tenemos: probabilidad de falso positivo y negativo, sensibilidad y especificidad, selectividad, límite de detección, incertidumbre, robustez entre otros.

3.3.1.1 En la validación de métodos analíticos cualitativos(24), se tiene que los principales parámetros de calidad, como son: sensibilidad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos, región de incertidumbre, límite de corte, límite de detección, confiabilidad diagnóstica, selectividad y adecuabilidad. Se hace uso de la comparación entre otro método de referencia con el método a validar.

La adecuabilidad del método consiste en comprobar los componentes y reactivos funcionen correctamente, así como el almacenamiento, fecha de caducidad, presencia o ausencia de contaminantes deben ser verificadas o el analito debe estar presente.

La Selectividad del método consiste en evaluar aplicando la prueba al mismo número de muestras, es decir investigar como el método se comporta en dos poblaciones diferentes. Se usa las tablas de contingencia 2x2 para comprobar la selectividad.

La sensibilidad y especificidad son dos parámetros importantes para validar un método analítico. Entendiéndose por sensibilidad como la probabilidad de que la respuesta analítica resulte positiva, cuando en la muestra estudiada esta el analito o el sustrato de interés en los límites de detección. La especificidad es la probabilidad de que la respuesta analítica resulte negativa, en la que la

muestra estudiada no está el analito o sustrato por debajo del límite de detección. Se usa las tablas de contingencia 2x2 para comprobar los parámetros anteriores.

Falsos positivos y falsos negativos. En los falsos positivos son las muestras que realmente no contiene el analito por encima del valor máximo permitido y que al aplicar el método dan un respuesta positiva y los falsos negativos son las muestras que contienen uno o mas analitos por encima del valor límite permitido y que al aplicar el método dan una respuesta negativa.

El valor predictivo positivo de un método analítico es la probabilidad de que el analito o sustrato de interés este presente o en la cantidad mínima detectable cuando la prueba resulte positiva y **el valor predictivo negativo** de un método analítico es la probabilidad de que el sustrato de interés o analito está ausente o en cantidad inferior a lo detectable cuando la prueba resulto negativa.

La confiabilidad diagnóstica es la probabilidad de que en una serie de muestras se detecte correctamente el analito o sustrato de interés nos dé una respuesta analítica positiva. Es decir es la probabilidad de que en un individuo tomado al azar se tenga la enfermedad dado que la prueba resulte positiva.

El límite de detección es la mínima cantidad de sustrato o analito en una muestra sea capaz de encontrar positivo con el método analítico. Se evalúa haciendo diluciones sucesivas de concentraciones conocidas del analito, como minino por quintuplicado y determinando la respuesta analítica.

Los métodos analíticos cualitativos son métodos de resultados bivariados de dos respuestas SI/NO, ausente/presente y para validarlos es necesario comprobar el resultado contra un característica de referencia exacta. **(39)**

Se hace la aclaración de que no hay métodos validados para análisis de hortalizas, sino que se hace uso de métodos parasitológicos de heces que son adaptados a muestras de hortalizas.

Figura 1. Diagrama de flujo para la validación de ensayos cualitativos

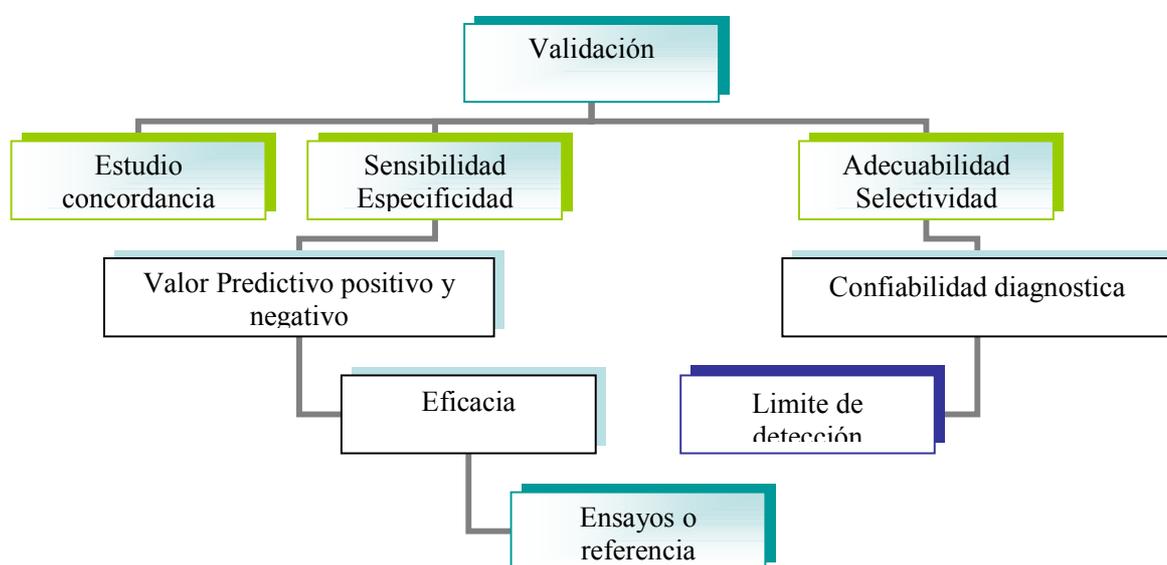


Tabla. 1. Parámetros de validación para tipo de prueba microbiológica cuantitativa y cualitativa.

Parámetro	Prueba cuantitativa	Prueba Cualitativa
Exactitud	Si aplica	No
Precisión	Si aplica	No
Sensibilidad	Si aplica	Si
Especificidad	Si aplica	Si
Limite de detección	No aplica	Si
Limite de cuantificación	Si aplica	No
Linealidad	Si aplica	No
Robustez	Si aplica	No
Repetibilidad	Si	No

Fuente USP 31,2008

Tabla. 2. Datos requeridos para validación

Características de desempeño	Categoría I	Categoría II	Categoría III	Categoría IV
Sensibilidad	Si	Si	-	Si
Especificidad	Si	Si	-	Si
Valor predictivo positivo	Si	Si	-	Si
Valor predictivo negativo	Si	Si	-	Si
Eficacia	Si	Si	-	Si
Limite de detección	No	Si	Si	Si
Limite de cuantificación	Si	Si	No	Si

Categoría I: Procedimientos analíticos para la cualificación del analito. Categoría II: procedimientos analitos que incluyen análisis cuantitativo. Categoría III: procedimiento analito para determinar o identificar características. Categoría IV: Pruebas de identificación del analito.

Fuente USP 31,2008.

3.3.1.2 En la validación de los métodos cuantitativos.

En la validación de métodos microbiológicos según las normas ISO 16140, en la que se toman aspectos o criterios de validación los siguientes parámetros:

Exactitud. Capacidad que tiene el método analítico para dar resultados lo más próximo posible al valor real. Se requiere estimar si existe diferencia significativa en la exactitud entre el método a evaluar y el método Gold estándar o de referencia.

Precisión. Capacidad que tiene el método para encontrar parásitos, utilizando diferentes concentraciones para precisar grado de cuantificación recuperable, es decir mide que tan próximo estén los resultados del otro. Para la precisión se toma en cuenta también la repetibilidad y la reproducibilidad.

Repetibilidad: se refiere a la utilización de un procedimiento analítico durante un periodo corto de tiempo realizado por el mismo analista, con el mismo equipo, donde se trata de recuperar el analito y compararlo entre ambos.

Reproducibilidad: Viene dado por la capacidad que tiene el método de ser reproducido. Se requiere un mínimo de 10 repeticiones.

Especificidad y Sensibilidad: la sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente al analito y la especificidad es la capacidad que tiene el método de no detectar el analito.

Limite de cuantificación. Es la cantidad mínima del analito que puede obtenerse, o es la capacidad que tiene el método de recuperar el analito.

Linealidad. Capacidad del método en que sus resultados son directamente proporcionales a la concentración del analito.

Robustez. Consiste que a menores concentraciones de volumen, la prueba tiene la capacidad de identificar el analito.

3.4. Documentación. Se deja constancia de que sea un método que proporcione información necesaria para el correcto funcionamiento y que son los resultados esperados.

3.5. Protocolo de validación. Se hizo un documento detallado, así como las pruebas y reactivos a utilizar como el procedimiento que se detalla en este protocolo, descripción del equipo a utilizarse, la operación y limpieza del equipo, los objetivos, lugar de estudio, nombre de responsables, tipo de método, muestra, descripción del procedimiento entre otros.

3.6. Del informe Técnico. Se registraron los resultados obtenidos en hojas de cotejo.

3.7 Evaluación de los resultados microbiológicos. Se realizó una discusión de los resultados y conclusiones, en donde se dejó constancia de firmado por las personas analistas, indicando si se acepta o rechaza validación. Para la Fase de evaluación de hortalizas.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4. 0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio es concurrente y Experimental con un nivel alfa de 0.05 %. Es concurrente por información requerida que se evaluó un nuevo método y comparó con otro de referencia utilizado como análisis en los laboratorios clínicos. El estudio experimental se basó en ensayos repetitivos del método así como controlar las variables. Se utilizaron muestras de hortalizas como Lechuga y Cilantro. El pool de parásitos estaba conformado por protozoarios y helmintos recolectados de heces humanas, que son más prevalentes en hortalizas. Se demostró por criterios microbiológicos cualitativos y cuantitativos la validación del método de filtración, utilizando cálculos estadísticos estandarizados según criterio de validación. Las muestras fueron 100 frascos inoculados artificialmente con 1 ml del pool de parásitos por especie más 40 hortalizas inoculadas artificialmente con 1 ml del pool y 40 hortalizas naturales provenientes de los mercados La Tiendona, San Miguelito y Central. Total 180 muestras.

4.2 Fase experimental y de campo.

Se realizó en dos fases, la primera fase en desarrollar el método de filtración y la segunda fase validar el método de filtración por los métodos cualitativo y cuantitativo.

El estudio se realizó en el laboratorio del Centro de Investigación y Desarrollo en salud (CENSALUD), laboratorios de inocuidad de alimentos y laboratorio de

microbiología de la Facultad de Medicina. Las muestras fueron hortalizas provenientes de mercados municipales del área metropolitana del distrito 1 y 2 denominados A, B, C con un total de 40 muestras, al azar correspondiendo 13 hortalizas a cada mercado (7 de cilantro y 6 lechuga) y una más de control, para muestras naturales, luego otras 40 muestras fueron inoculadas artificialmente provenientes de mercados municipales del área metropolitana del distrito 1 y 2 denominados A, B, C correspondiendo en su orden La Tiendona, Central y San Miguelito con un total de 39 muestras más 1 control inoculadas del pool con huevos de helmintos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y cestodos como huevo de *Taenia sp*, quistes como *Entamoeba coli* y *Entamoeba histolytica* a partir de heces fecales. Son 40 Muestras naturales y 40 muestras inoculadas. Total 80 muestras naturales.

4.3 Métodos de laboratorio de filtración y de Ritchie (de Referencia)

Es necesario reiterar que no hay métodos de estudio de validación para diagnosticar parásitos en muestras crudas de hortalizas. Se hizo análisis cualitativo y cuantitativo con el objeto de validar el método de filtración. Pero se aclara que no es necesario la validez cuantitativa ya que el método en si es cualitativo para diagnosticar si una hortaliza es positiva o negativa a un determinado parasito en particular o recuperar de una inoculación de igual forma.

Los métodos físicos más utilizados son Ritchie y Sheater: Por sedimentación y por Flotación, la técnica de sedimentación estandarizada conocida como Sheater/Willis.

Método de referencia (Ritchie) (27)

Como método de referencia se utilizó el método de Ritchie, que es una técnica de concentración fecal por centrifugación, que consistió en: tomar 5 g de muestra por lavado en 10 ml de solución fisiológica, pasar por una gasa doble y húmeda a un tubo de centrifuga de 15 ml, se centrifuga a 1500 rpm por dos minutos, decantar el sobrenadante y diluir el sedimento en solución salina, centrifugar como antes y decantar.

Agregar al sedimento aproximadamente 10 ml de formol al 10 %, mezclar bien y dejar reposar cinco minutos. Agregar 3ml de éter, tapar el tubo y mezclar fuertemente por 30 seg. Centrifugar a 1.500 rpm por dos minutos y decantar. Observar el sedimento con lugol.

Al momento no hay estudios que respalden el uso para hortalizas el método de filtración al vacío, lo que permitirá emplear nuevas metodologías para el diagnóstico de parásitos en hortalizas.

Marcha método de Ritchie (Formol-éter)

1. Tomar una muestra de aproximadamente 5 g de material fecal (para hortalizas 10 g) y agregarle 30 ml de agua mezclándola de forma homogénea.
2. Filtrar la suspensión a través de un colador o gasa y ayudándose con un embudo llenar el tubo de ensayo a 2 o 3 mm antes del borde.
3. Balancear con otro tubo de ensayo lleno de agua y centrifugar durante un minuto a 2500 r.p.m.

4. Decantar el sobrenadante y agitar el sedimento; agregar agua hasta llenar el tubo (efectuar los pasos 3 y 4 las veces que sean necesarias hasta que el sobrenadante sea claro).
5. Agregar 4ml de formol al 10% durante 10 minutos.
6. Agregar 2 ml de eter, tapar el tubo y agitar vigorosamente durante 30 seg. destapando lentamente para que el contenido no salga al exterior.
7. Centrifugar un minuto a 1500 r.p.m. Se observan cuatro capas: 1. eter, 2- restos, 3-formol, 4-sedimento.
8. Decantar el sobrenadante.
9. Agregar una gota de colorante al sedimento.
10. Colocar una gota del sedimento sobre un portaobjeto. Se observa la preparación en el microscopio con objetivo 10x y 40x.

Método de filtración para muestras inoculadas y crudas de hortalizas

El estudio se procedió en tres fases: la primera en hacer pool e inocular artificialmente luego se analizó recuperación, posteriormente recolectar hortalizas en mercados de la región metropolitana de los mercados La Tiendona, Central y San Miguelito (Mercados A,B y C respectivamente); la segunda fase consistió en la utilización del método filtración al vacío; y la tercera fase en el diagnóstico parasitológico de quistes, huevos etc. e identificación de las formas parasitarias en método de validación, método de referencia y examen de hortalizas inoculadas y no inoculadas.

Materiales a usar: muestras del pool de parásitos 1ml, muestras frescas de Hortalizas: cilantro, lechuga, bolsas plásticas estériles, Equipo especial de

filtración al vacío, tijera, microscopio, placas de petri, laminas portaobjetos, pinceles recortados no absorbentes de cerdas de nylon, centrifugadora, éter, formol al 10 %, solución salina, gasa, vortex, laminilla cubreobjetos, pinza, beaker de 600 ml, elermenyer, filtros No 2 de 2 micras de retención de celulosa marca Ahlstrom u otra similar de calidad. NOTA: Usar guantes y mascarilla.



Figura 2 : Cilantro y lechuga

Si la muestra es cilantro (*Coriandrum sativum*): pesar 30 g unidad por raíz y ramas, remojar por dos minutos luego lavar y agitar en bolsa plástica estéril todas las ramas con la raíz; si es lechuga (*Lactuca sativa*): pesar 100 g remojar por dos minutos luego lavar cada hoja solamente de la superficie ambos lados al igual que el tronco, lavar agitando en bolsa plástica estéril. Si con los pasos anteriores hay muchos grumos lavar con agua destilada y filtrar con gasa doblada en cuatro en un beaker ancho o en embudo del equipo de filtrado al vacío sujeta con hule alrededor del embudo o beaker, recolectar agua filtrada. Se recomienda usar filtros menores o igual a 2 micras para huevos, quistes, larvas y adultos. Entre menor sea el diámetro de poro de 2 micras mejor será la recuperación de los parásitos.

Equipo filtración al vacío. Se utilizó un equipo moderno de filtración al vacío, primero hacer las conexiones necesarias de las mangueras que van al kitasato y al equipo de filtrado, colocar el filtro de diámetro de 4.5 cm en el extremo y

luego colocar el embudo de buchner en el equipo sujetándolo con una pinza especial de presión, abrir válvula y cerrar las otras si no las ocupa que están al centro en el extremo inferior.

4.4 Estandarización del método de FILTRACION:

Primera fase: Hacer pool e inocular 1ml artificialmente en tubos con agua destilada luego se cuantifica recuperación. Se hizo preparación de la muestra natural: Se pesó hortaliza y se dejó en remojo en 30 ml de agua destilada por dos minutos en bolsa plástica transparente, luego se lavó vigorosamente y se frotó por varios minutos. Si hay muchos grumos filtrar con gasa doblada en 4 en embudo Buchner o beaker sujeta con hule alrededor de boca del embudo. Recolectar en un beaker de 600 ml. Inocular 1 ml del pool de parásitos. No usar Stomacher.

Segunda fase: Del preparado se procedió a lo siguiente: Filtrar todo el liquido comenzando con 10 ml en cada recambio en filtro de celulosa No 2 de 2 micras de retención marca Ahlstrom u otro similar de calidad recortarlo a 4.5 cm de diámetro al del embudo de buchner, colocarlo en aparato especial de filtración al vacío, presionar una vez el botón tan rápido para el inicio de succión, si el filtro esta permeable puede filtrar todo el volumen. (Se recomienda no usar papel filtro porque se obstruyen todos los poros del filtro pero si no hay otra alternativa, usar papel filtro de 2 micras u otro similar de 0.45 micras de celulosa, del pliego recortar y hacer circunferencias del diámetro del filtro a 4.5 cm, filtrar solamente 10 ml del volumen inicial). Retirar filtro con pinza y colocarlo hacia arriba en una caja de petri o Erlenmeyer, Si usó Erlenmeyer colocar en vortex o agitador a velocidad de 4, sujetándolo por dos minutos, o si

uso placa de petri inclinarla, luego con pincel estéril (recortado extremo recto no absorbente de nylon) arrastrar a la superficie agregando 0.50 ml de agua destilada o solución salina 0.83 % desde el centro hasta el borde caja de petri, con una pipeta pasteur cortada examinar y aspirar todo el líquido y colocar una gota y transferirlo a un portaobjetos y cubreobjetos y examinar al microscopio bajando el diafragma a 10 x para detectar huevos y larvas y 40 x para identificar quistes. Al final hacer reporte cualitativo o cuantitativo de parásitos. Hacer 5 frotis por filtro.

MARCHA METODO DE FILTRACION

1. Hacer pool e inocular 1ml artificialmente en tubos con agua destilada luego se cuantifica recuperación o Pesar hortaliza y dejar en remojo en 30 ml de agua destilada por dos minutos en bolsa plástica transparente, luego lavar vigorosamente y frotar por varios minutos.
2. De la bolsa recolectar en un beaker de boca ancha el líquido. Si hay muchos grumos lavar con gasa doblada en 4 en embudo Buchner del equipo de filtrado al vacío o Beaker sujeta con hule alrededor de boca del embudo. No usar stomacher
3. Del líquido obtenido filtrar todo con 10 ml en cada recambio con filtro No 2 de 2 micras de celulosa marca Ahlstrom u otro similar de calidad recortarlo a 4.5 cm en diámetro del embudo de buchner, colocarlo en aparato de filtración al vacío, presionar una vez el botón de bomba tan rápido para el inicio de succión si el filtro esta permeable puede filtrar todo el volumen. (Se recomienda no usar papel filtro porque se obstruyen todos los poros del filtro pero si no hay otra alternativa, usar papel filtro de 2 micras o de 0.45 micras

de celulosa, del pliego recortar y hacer circunferencias de 4.5 cm al del diámetro del embudo, filtrar solamente 10 ml del volumen inicial).

4. Retirar filtro con pinza y colocarlo con la superficie hacia arriba en una caja de petri e inclinarla agregando 0.50 ml de agua destilada o solución salina 0.85 % con pipeta pasteur al centro del filtro.
5. Con pincel estéril (recortado extremo recto no absorbente de nylon) arrastrar y lavar la superficie del filtro desde el centro de caja de petri hacia el borde.
6. Si usó Erlenmeyer colocar en vortex o agitador a velocidad de 4, sujetándolo por dos minutos.
7. Con una pipeta pasteur recortada examinar y aspirar todo el líquido y colocar una gota y transferirlo a un portaobjetos y examinar en microscopio a 10 x con diafragma hacia abajo para detectar huevos y larvas y 40 x para identificar quistes. Hacer 3 a 5 láminas por filtro.

4.5 Validación del método de filtración versus método de Ritchie.

En la primera parte se procedió a validar el método utilizando filtración al vacío, utilizando filtros de 2 micras de celulosa. Su propósito fue inocular un pool de parásitos y obtener porcentaje de recuperación por método cuantitativo.

En la segunda parte se procedió a inocular muestras naturales un pool de parásitos utilizando el método de filtración. Su propósito fue determinar por método cualitativo presencia o ausencia de parásito y cuantitativo por recuperación de lo inoculado. De igual forma se procedió con las muestras a examinar en muestras naturales de los mercados para determinar presencia o ausencia de parásitos.

4.5.1 Método microbiológico: 1. Método microbiológico cualitativo. De acuerdo a la AOAC Internacional Guía cualitativa y cuantitativa de métodos de validación. 1999. Estableciendo 1ª muestras natural contaminada, 2ª contaminación artificial por mezcla, 3ª muestras inoculadas y 4ª materiales de referencia. Se estudió Adecuabilidad, selectividad, sensibilidad y especificidad, valor predictivo, confiabilidad diagnóstica y límite de detección.

2. Método microbiológico cuantitativo. Se basan en las normas ISO 16140 en la que se utilizaran los siguientes criterios de validación: Se estudió exactitud, falsos negativos y positivos, especificidad (límite de cuantificación, linealidad), precisión (repetibilidad y reproducibilidad). **(22,25)**

De acuerdo las normas ISO 16140:1999 estableciendo dos opciones: A. Muestras inoculadas para validar el método y B. Muestras naturales contaminadas y no contaminadas para diagnosticar parasitosis por el método de filtración. Se procedió para cada hortaliza análisis por duplicado el método a validar. Se requirió uso de parásitos como referente. Para el caso se tomaron cualquiera que resulte positivo se tomó como muestra positiva contaminada con parásitos intestinales, que fueron de helmintos y protozoarios como ***Entamoeba histolytica***, ***Giardia lamblia***, ***Isospora belli***, ***Balantidium coli***, entre los comensales están: ***Entamoeba coli***, ***Endolimax nana***, ***Iodamoeba butschlii***, ***Chilomastix mesnili***, ***Blastocystis hominis*** y entre los helmintos están: ***Ascaris lumbricoides***, ***Hymenolepis nana***, ***Hymenolepis diminuta***, ***Trichuris trichiura*** en el caso de muestras naturalmente contaminadas.

4.5.1.1 Criterios de evaluación según 1999 Guía de métodos analíticos no cuantitativos y guía de validación de métodos microbiológicos Internacionales AOAC (International Qualitative and Quantitative. Microbiology Guidelines form Methods Validation). se evaluaron los siguientes parámetros: **(21,19)**

***Análisis método Cualitativo:**

Adecuabilidad. Consiste en corroborar que los componentes y reactivos involucrados en la obtención de los datos funcionen adecuadamente. Verificar fecha caducidad, presencia o ausencia del analito, si hay contaminantes. Confirmación por clasificación taxonómica.

Interpretación estadística: ninguno

Selectividad. Se investiga si el resultado del método de filtración diferencia el analito positivo de los negativos. En la que tienen comportamientos semejantes según características. En nuestro caso se investigó si el resultado del método de filtración resulto positivo. Se utilizó procedimiento estadístico para determinar la selectividad del método alternativo por la siguiente fórmula:

c) Calcular los siguientes valores

$$A_{\text{esperado}} = \frac{E \times G}{I} \quad B_{\text{esperado}} = \frac{F \times G}{I}$$

$$C_{\text{esperado}} = \frac{E \times H}{I} \quad D_{\text{esperado}} = \frac{F \times H}{I}$$

d) Realizar las siguientes operaciones

$$\begin{aligned} A - A_{\text{esperado}} &= \text{-----} = A^* \\ B - B_{\text{esperado}} &= \text{-----} = B^* \\ C - C_{\text{esperado}} &= \text{-----} = C^* \\ D - D_{\text{esperado}} &= \text{-----} = D^* \end{aligned}$$

e) Calcular los siguientes índices

$$\alpha = \frac{(A^*)^2}{A_{\text{esperado}}} \quad \beta = \frac{(B^*)^2}{B_{\text{esperado}}}$$

$$\kappa = \frac{(C^*)^2}{C_{\text{esperado}}} \quad \delta = \frac{(D^*)^2}{D_{\text{esperado}}}$$

f) Determinar la χ^2 calculada:

$$\chi^2 \text{ calculada} = \alpha + \beta + \kappa + \delta$$

Su interpretación es: Si χ^2 calculada es mayor que χ^2 tablas se concluye que el método analítico tiene selectividad. Por el caso contrario si χ^2 calculada es menor que χ^2 tablas el método analítico carece de selectividad.

Sensibilidad y especificidad. La sensibilidad es la probabilidad de que el analito este presente resulte positiva y la especificidad es la probabilidad de que el analito en la muestra estudiada no este y resulte negativa. En nuestro caso se utilizaron del pool de parásitos protozoarios y helmintos.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{A}{A + C}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{D}{D + B}$$

Donde A es verdadero positivo, y A+C es la suma de los casos, y D es verdadero negativo, y D+B es la suma de los controles.

Su interpretación es: Si la sensibilidad es menor de 0.95 el método analítico no tiene sensibilidad, si la sensibilidad es mayor o igual a 0.95 el método analítico tiene buena sensibilidad. Si la especificidad es menor de 0.95 el método analítico no tiene buena especificidad, si la especificidad es mayor o igual de 0.95 el método analítico tiene buena especificidad.

Valor predictivo positivo (VPP). Probabilidad de que el analito este presente o en la cantidad mínima detectable cuando la prueba resulte positiva. Se calculo por:

$$\text{VPP} = \frac{A}{A + B}$$

Su interpretación es: para que sea estadísticamente valido, se dice si VPP es menor a 0.95 el método analítico no tiene buen valor predictivo positivo, si VPP es mayor o igual a 0.95 el método analítico tiene buen valor predictivo positivo.

Valor predictivo negativo (VPN). Probabilidad de que el analito de interés está ausente o en cantidad inferior a la mínima detectable, cuando la prueba resulte negativa. Se cálculo por:

$$VPN = \frac{D}{C+D}$$

Su interpretación es: si VPN es menor a 0.95 el método no tiene buen valor predictivo negativo, si VPN es mayor o igual a 0.95 el método analítico tiene buen valor predictivo negativo.

Confiabilidad diagnóstica. Probabilidad de detectar correctamente el analito de interés. En nuestro caso si en las muestras en ambos métodos se reporta el analito de cualquier parásito presente en las muestras inoculadas y naturales. Se cálculo por:

$$P(G^+|T^+) = \frac{\left(\frac{A}{A+C}\right)\left(\frac{A+C}{A+B+C+D}\right)}{\left(\frac{A}{A+C}\right)\left(\frac{A+C}{A+B+C+D}\right) + \left(\frac{B}{B+D}\right)\left(\frac{B+D}{A+B+C+D}\right)}$$

Interpretación estadística es: Si P(G) T es menor a 0.95 el método analítico no tiene buena confiabilidad diagnostica para detectar correctamente el sustrato de interés. Si Si P(G) T es mayor o igual a 0.95 el método analítico tiene buena confiabilidad diagnostica para detectar correctamente el sustrato de interés.

Limite de detección. Es la mínima cantidad de analito detectado en una muestra, en nuestro caso la mínima es 1 parásito y la máxima 10 o más parásitos en uno o varios campos del análisis procedente en muestras inoculadas y naturales.

Interpretación estadística es: si detecta los parásitos es capaz de generar una respuesta analítica positiva en el método analítico.

4.5.1.2 Criterios de evaluación según guía de validación de métodos microbiológicos por la AOAC. (ASOCIACION OFICIAL DE QUIMICOS ANALISTAS para métodos analíticos cuantitativos. Norma ISO 16140. (21,22)

***Análisis método Cuantitativo:**

Recuperabilidad. Para estimar la recuperabilidad es el cociente entre la cantidad del analito y el contenido en la muestra. Se utilizó la fórmula siguiente:

$$\% \text{ recuperación} = \left[\frac{\text{Valor obtenido}}{\text{Valor de referencia}} \right] \times 100$$

Interpretación estadística es: El porcentaje de recuperación tiene que ser mayor o igual a 95 o cercano a 100 para considerarse aceptable. Valores menores indican menor cantidad del analito recuperada por lo que el método no es aceptable.

Exactitud. Capacidad que tiene el método analítico para dar resultados lo más

próximo posible al valor real o teórico (11). Se requiere estimar si existe diferencia significativa en la exactitud entre el método a evaluar y el método Gold estándar o de referencia (método convencional de Ritchie), así como comparar si la diferencia entre las medias del método a validar y el control es significativa. Es decir se realizaron 100 repeticiones o determinaciones por ambos métodos para estimar el grado de parásitos de las muestras comparándolas estadísticamente por métodos de significancia estadística. Su criterio de aceptación fue la Prueba t de Student. y ANOVA.

Su Interpretación estadística es: Si F_c calculado es mayor que F_t tablas, entonces se acepta la hipótesis de investigación y se rechaza la hipótesis nula por lo que existe diferencias estadísticamente significativas.

Precisión. Capacidad que tiene el método para encontrar parásitos, cuando se aplica repetidamente en una muestra utilizando el método de referencia y el evaluado. Es decir que en 1 a 500 campos se espero encontrar de 1 a 10 parásitos. Su criterio de aceptación no debe exceder el 15-20 % del coeficiente de variación. (11). Se utilizó estadística inferencial, estimando: análisis de varianza, desviación estándar o coeficiente de variación (CV) de la repetitibilidad del método, coeficiente de variación (Cv) de la reproductibilidad entre dos analistas. Así como tablas de contingencia para estimar nivel de significancia entre las muestras. Se uso la siguiente fórmula: de Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \quad s^2 = \frac{\sum x_i^2 n_i}{n} - \bar{x}^2 \quad s = \sqrt{s^2}$$

En el caso de la t Student, su interpretación estadística es: Si T_c es mayor que T_t se acepta hipótesis a y se rechaza hipótesis nula, por lo tanto p es menor de 0.05. El coeficiente de variación no debe ser mayor del 15 %.

A. Repetibilidad: Para validar el método se hicieron 10 repeticiones. Se espero encontrar S_r y CV_r , para cada muestra, por la formula: $Cv (\%) = S_r/Y \times 100$
 $Y = \sum y/n$ $CV_r (\%) < 2$ para análisis microbiológico. Donde: S_r = desviación estándar de la repetibilidad de la media de 10 repeticiones, Y = Promedio de valores individuales. Se compararon ambos resultados si hay discrepancia o similitud o si existe diferencias altamente significativas, realizado bajo las mismas circunstancias de cada uno de los analitos obteniéndose valores de coeficiente de variación. Se usó la siguiente fórmula: VARIANZA (s^2): es el promedio del cuadrado de las distancias entre cada observación y la media aritmética del conjunto de observaciones.

$$s^2 = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 n_i}{n}$$

Haciendo operaciones en la fórmula anterior obtenemos otra fórmula para calcular la varianza:

$$s^2 = \frac{\sum_i x_i^2 n_i}{n} - \bar{x}^2$$

Interpretación estadística es: mientras mayor sea la dispersión de las observaciones entre la observación uno y dos, entonces mayor es la desviación respecto a la media aritmética y por ende mas alto el valor numérico de la

varianza. O Cuanto mayor sea la varianza mayor dispersión existirá y por lo tanto menor representatividad tendrá la media aritmética. El CV no mayor 15%. DESVIACIÓN TÍPICA (S): La varianza viene dada por las mismas unidades que la variable pero al cuadrado, para evitar este problema podemos usar como medida de dispersión la desviación típica que se define como la raíz cuadrada positiva de la varianza.

$$s = \sqrt{s^2}$$

B. Reproducibilidad y repetibilidad intralaboratorio: Viene dado por la capacidad que tiene el método de ser reproducido. Su criterio de aceptación es que no debe exceder el 15 % del coeficiente de variación (11). Se determina por la capacidad que tiene el método de reproducir para detectar parásitos en las muestras según diseño metodológico de prueba. Dos analistas realizaron por duplicado muestra más control. Se utilizó coeficiente de variación. Se usó la siguiente fórmula: Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

Interpretación estadística es: si el cálculo es mayor con respecto al otro, indica que presento una mayor dispersión con respecto al otro de la media, caso contrario si es menor el coeficiente de variación indica que presento una menor dispersión respecto a la media que el numero 1. Es decir el menor coeficiente de variación indica que presentó menor dispersión con respecto a la media comparado con el otro. El coeficiente de variación no debe exceder el 15%.

C. Falsos negativos y positivos: Interpretación estadística es: en los falsos negativos cuando el método resulte negativo cuando la muestra contiene un parásito, y falso positivo cuando resulte positivo cuando la muestra no contiene el analito. Se utilizó microscopia por análisis de muestra prueba positiva a parásitos, así como las tablas de contingencia para estimar los falsos negativos con su valor predictivo de prueba negativa. Se usó las tablas de contingencia.

Especificidad y Sensibilidad.

Para comprobar la especificidad del método analítico se prepararon muestras con el Standard y se realizaron por duplicado. Se determinó por método estadístico estimando la sensibilidad de la prueba con el método convencional, y si realmente hay diferencias significativas en ambas pruebas. La sensibilidad se comprueba probando 2 puntos de la recta de linealidad por medio de agregar un parásito de modo de comprobar si el método detecta el estándar agregado y la especificidad capacidad para detectar el analito (parásito) diferenciándolo de otros. La prueba se documentó con tablas de contingencia 2x2.

La sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar el analito. La fórmula es la siguiente: Sensibilidad

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Donde VP es verdadero positivo, y FN es falso negativo.

Y la especificidad es: Especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos.

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

Donde VN es verdadero negativo y FP es falso positivo.

Interpretación estadística es: Idem

Limite de cuantificación. Es la cantidad mínima del analito que puede obtenerse, o es la capacidad que tiene el método de recuperar el analito. Se hizo evaluación cualitativa.

$$\% \text{ recuperación} = \left[\frac{\text{Valor obtenido}}{\text{Valor de referencia}} \right] \times 100$$

Su interpretación estadística es: cantidad de recuperación del analito determinado por porcentaje de recuperación mayor o igual a 95 % recuperado.

Linealidad. Capacidad del método en que sus resultados son directamente proporcionales a la concentración del analito. (11). Se trabajara con 100 y 40 muestras. Por método estadístico de regresión se demuestra la concentración proporcional a la detección de parásitos positiva en las láminas, encontrando el numero de analitos encontrados por muestra entre 1 a 500 campos. Se usa la siguiente fórmula: Las rectas de regresión son las rectas que mejor se ajustan a la nube de puntos (o también llamado diagrama de dispersión) generada por una distribución binomial. Matemáticamente, son posibles dos rectas de máximo ajuste:

- La recta de regresión de Y sobre X:

$$y = \bar{y} + \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x^2}(x - \bar{x})$$

- La recta de regresión de X sobre Y:

$$x = \bar{x} + \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_y^2}(y - \bar{y})$$

Interpretación estadística es: cuando al aumentar una variable crece también la otra, la correlación es directa. Entonces si r se aproxima a +1 entonces es directa y si es -1 entonces es inversa la relación.

Robustez. Consiste que a menores concentraciones de volumen, la prueba tiene la capacidad de identificar parásitos intestinales de protozoarios y helmintos, por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona un índice de confiabilidad durante su uso. Se utilizó diluciones menores de 1×10^{-5} del inoculo.

4.5 Preparación del inóculo de parásitos.

Para las muestras artificialmente contaminadas se preparó un pool de parásitos en un 1 ml conteniendo en promedio de 10 huevos de: ***Ascaris lumbricoides***, ***Trichuris trichiura*** y cestodos como de ***Taenia sp***, o en su efecto en promedio 10 quistes de: ***Entamoeba coli*** y ***Entamoeba histolytica*** a partir de heces fecales positivas a parásitos preservadas en formol al 1 %. Se hicieron 10 repeticiones de cada uno en total fueron 100 muestras. Luego se inocularon a muestras de hortalizas por separado e individual cada parásito del pool y se espero recuperar un número en promedio de 1 a 10 en cada hortaliza inoculada según parásito de especie. Se consideró positivo resultado si se recupero en promedio más de 1 a 10 parásitos de cualquier especie por repetición.

Para obtener un pool de parásitos de la misma especie, se procedió primero a tener un volumen de 150 ml de muestras de heces positivas a parásitos de protozoarios y helmintos preservadas en formol 10 %, luego por el método de Ritchie se procedió a obtener una concentración de parásitos, luego se examinó en el microscopio a 10 x con solución salina 0.83 % , se identificó el parásito y con una pipeta Pasteur se aspiró y se colocó en un frasco de vidrio la cantidad necesaria del parásito y se clasificó por genero y especie, luego por cada 1 ml había aproximadamente 10 parásitos. Luego se procedió a agregar al agua destilada 1 ml del parásito en un volumen de 30 ml y se procedió a filtrar al vacío utilizando un filtro menor o igual de 2 micras para recuperar el número de parásitos y se hizo recuento de recuperación.

En la segunda parte se inocularon las muestras de hortalizas frescas con 1 ml del pool de parásitos conteniendo cada género y especie del preparado anterior y se dejó reposar, luego se recuperó el parásito huevos o quistes dependiendo de lo inoculado por método cualitativo indicando presencia o ausencia y cuantitativo por recuperación. Posteriormente se aplicó el método de filtración y el método de referencia Gold Estándar y se compararon ambos resultados, se esperó encontrar por método cualitativo de 1 a 10 parásitos para considerarlo valido el método y por método cuantitativo la recuperación mayor o igual a 95 %. Se inocularon artificialmente a 40 muestras de hortalizas y a las naturales no les aplicó ningún inculo solamente se examinaron si había presencia o ausencia de parásitos sin cuantificar por análisis cualitativo. Luego se hizo recuento de parásitos en las láminas para determinar recuperabilidad en las muestras inoculadas.

En general el método es adecuado para todos los parásitos intestinales de forma quística, larvaria y adulta, porque cualitativamente los identifica tanto en las muestras inoculadas y naturales. Entre algunas de las características más frecuentes fueron: su tamaño, ya que por el método de filtración permite que los parásitos con diámetro menor de 30 micras se retienen en el filtro, y si son mayores de 30 micras quedan también en la superficie y no pasan el filtro reteniéndose en las redes del filtro, algunos parásitos por la fuerza de succión pueden ser flexibles y pasar el filtro, por lo que se recomienda sea el filtro menor de 2 micras, luego se lavan por arrastre con agua destilada para que se desprendan del filtro y se haga la identificación morfológica del genero y especie en particular, la forma de larva o adulto quedan a simple vista y se pueden identificar. Otra característica fue la morfología de quiste, huevo, larva o adulto, ya que existen características especiales que los distingue entre genero

y especie, En alimentos las formas más comunes de diagnóstico son quistes, huevos y larvas. Otra fue el color aunque si bien no se colorean todos, el lugol facilita identificarlos. Otra es el medio ambiente, las formas quísticas, huevos y larvas son muy resistentes a la desecación y calor, por lo que pueden estar viables por largos periodos de tiempo en días, meses o años. Las condiciones de humedad o desecación los hacen resistentes, se adhieren fácilmente a superficies para el caso en raíces, hojas y tegumentos.

Entre los criterios de evaluación de métodos analíticos cualitativos, fueron: que la mayoría con este método identifican la presencia o ausencia/detectado o no detectado de un determinado analito. Se tienen dos resultados: Resultado positivo: si el método identificó y se recuperó al parásito presente en la matriz, para el caso 100 muestras mas 40 muestras naturales y se comparo con otro para establecer diferencias significativas. Del estudio la recuperación del pool de parásitos fue sensible a cualquier parásito que estaba presente y recuperado de la inoculación y detectado en las muestras naturales.

4.6 Análisis de datos. Se hizo análisis estadístico en Excel 2007, se utilizó procesador de texto Word 2007, calculadoras on line, tablas de contingencia para comparar el método alternativo con la Prueba de Gold Standard (método de Ritchie) para determinar la sensibilidad y especificidad de ambos métodos, se utilizaran gráficos de correlación lineal, entre otros para demostrar las hipótesis planteadas en el estudio.

Para la muestra se utilizó la t de student. Se compararon muestras inoculadas y naturales, para determinar la recuperación y detección en forma cualitativa la presencia o ausencia de parásitos intestinales en las muestras de hortalizas

crudas de cilantro y lechuga procedentes de 3 mercados populares de San Salvador. Se utilizó el filtro No 2 de 2 micras marca Ahlstrom de celulosa, para análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras. Se aplicó la interpretación estadística de cada fórmula en relación a los resultados obtenidos, comparando el método de filtración y el método de Ritchie.

Cuadro No 1. Operacionalización de las variables.

Variables	Concepto	Unidad de análisis	de Escala de medición	Método
Método de concentración de Ritchie y método de filtración.	Método que se utiliza para concentrar los parásitos.	Centrifugadora Diluciones Filtros 2 micras Sobrenadante Hortalizas Filtración al vacío	Presente/no presente.(Cualitativo). Numero de parásitos recuperados. (Cuantitativo)	Filtración Centrifugación Observación. Examen directo de las muestras.
Parásitos intestinales.	Es una infestación nematodos, helmintos y protozoarios.	Quistes Huevos larvas	Presentes o ausentes. Genero y especie.	Clasificación taxonómica
Hortalizas.	Son un conjunto de plantas que se consumen en forma natural.	Lechuga Cilantro	Si o No	Método de filtración.
Método de análisis cuantitativo	Método que se utiliza para cuantificar	Numero de parásitos	Numérica	Observación.
Método de análisis cualitativo	Método que se utiliza para detectar	Presencia o ausencia de parásitos.	Si/NO. Presente/ausente.	Observación.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION

*** Recuperabilidad de inoculación.**

Porcentaje de recuperación:

Tabla No 6. Porcentaje de recuperación en muestras inoculadas filtración y Ritchie. n=100

	Filtración			Ritchie		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Recuperado	94	1	95	93	-	93
No recuperado	2	3	5	6	1	7
Total	96	4	100	99	1	100

De la tabla 4 y 6. El porcentaje de recuperación es 95 % por el método de filtración en una muestra de 100 tubos inoculados. Según la norma para que sea aceptado como criterio debe ser arriba de 95 o cercano a 100. En Ritchie es del 93%.

Tabla No 7. Total inculo en Método de filtración y Ritchie en muestras inoculadas usando filtros de 2 micras con 10 parásitos/ml en 100 muestras por inculo. Análisis cuantitativo.

Total Inculo*	Método de filtración			Método de Ritchie			
	Forma			Forma			
	Huevo	Quiste	Flagelado		Huevo	Quiste	Flagelado
1000	530	440	30	1000	530	440	30
%	53.00	44.00	3.00	%	53.00	44.0	3.00

* 10 parásitos

El inóculo utilizado es el mismo para los métodos de filtración y Ritchie, es decir se utilizó el mismo parásito para los dos métodos, el mismo pool de 1 ml se prepararon dos, uno para validación y otro para Ritchie hasta llegar a 100 tubos cada método.

Tabla 8. Recuperabilidad método de filtración y Ritchie en muestras inoculadas con 10 parásitos. Análisis cuantitativo. n=100

Método de filtración					Total R*	Método de Ritchie					Total R*
Total No de lámina						Total No de lámina					
1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
355	335	224	33	4	951	327	299	258	47	2	933
37.32	35.22	23.55	3.47	0.42	95.1	35.04	32.04	27.65	5.03	0.21	93.3

*Recuperación

$$\% \text{ recuperación} = \left[\frac{\text{Valor obtenido}}{\text{Valor de referencia}} \right] \times 100$$

En la tabla 8 se observa que por método de filtración el 95 % corresponde al total recuperado del analito de una muestra de 1000 parásitos entre huevos, quistes y flagelados, Del método de Ritchie el 93 % es recuperado el analito,

***Límite de cuantificación.**

Tabla No 9. Resultado de ensayo para determinar límite de cuantificación del método por filtración. Inoculo 1ml (10 parásitos) en 10 repeticiones de 1 ml..

Muestras/Repetición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	R*
Muestras filtración	9	10	10	10	9	10	9	10	10	10	97
Muestras Ritchie	10	9	10	10	10	9	10	10	10	10	98

***Recuperación**

El límite de cuantificación por ambos métodos se reporta que en 50 campos hay en promedio mínimo de 3 a 5 parásitos en forma de quistes, huevos y máximo 9 a 10 parásitos. Con un límite de detección de 1 a 10 parásitos en 500 campos según el método descrito anteriormente. Se inoculo 1 ml del pool de parásitos a cada una de las muestras, recuperando por lo menos de 9 a 10 parásitos entre las muestras.

-Repetibilidad.

Tabla No 10. Resultado ensayo para repetibilidad entre métodos en 10 repeticiones.

	Media	S	CV %
Muestras filtración	9.7	0.48	4.98
Muestras Ritchie	9.8	0.42	4.30

(viene de la tabla 9)

De las muestras inoculadas en 10 repeticiones no existe variabilidad significativa entre las medias, no hay mayor dispersión de datos entre un método y el otro del método de filtración por lo que la representatividad de la media es alta, porque cumple norma de CV menor de 15%.

***Exactitud**

Tabla No 11. 1 T-student. Resultados del ensayo para exactitud del método de filtración y Ritchie en muestras naturales. n80

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	<i>Ritchie</i>	<i>Filtración</i>
Media	0,425	0,375
Varianza	0,25064103	0,24038462
Observaciones	40	40
Varianza agrupada	0,24551282	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	78	
Estadístico t	0,4512819	
P(T<=t) una cola	0,3265193	
Valor crítico de t (una cola)	1,66462464	
P(T<=t) dos colas	0,6530386	
Valor crítico de t (dos colas)	1,99084704	

El cálculo de la t student para gl 78 valor Tc 0.45 y valor de Tt 1.99. Se concluye que no hay diferencia altamente significativa entre los promedios de las muestras, hay menor variabilidad por el método de filtración que el de Ritchie entre varianzas. Por lo que hay una asociación pero no por casualidad. El método de filtración detecta más que el método de Ritchie.

Tabla No 11. 2 T-student. Resultados del ensayo para exactitud del método de filtración y Ritchie en muestras naturales. n100

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	<i>Filtración</i>	<i>Ritchie</i>
Media	9,51	9,33
Varianza	0,25242424	0,22333333
Observaciones	100	100
Varianza agrupada	0,23787879	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	198	
Estadístico t	2,60963428	
P(T<=t) una cola	0,00487817	
Valor crítico de t (una cola)	1,65258578	
P(T<=t) dos colas	0,00975634	
Valor crítico de t (dos colas)	1,97201743	

En la tabla anterior se observa que si hay diferencias estadísticamente significativas entre el método de filtración y el método de Ritchie, concluyendo que el método de filtración es más efectivo que el método de Ritchie.

Tabla 11.3 Prueba F para varianzas de dos muestras para exactitud del método de filtración y Ritchie en muestras naturales. n100

Prueba F para varianzas de dos muestras

	<i>Filtración</i>	<i>Ritchie</i>
Media	9,51	9,33
Varianza	0,25242424	0,22333333
Observaciones	100	100
Grados de libertad	99	99
F	1,1302578	
P(F<=f) una cola	0,27178132	
Valor crítico para F (una cola)	1,39406126	

En la prueba F para varianzas entre el método de filtración y el método de Ritchie si hay diferencias estadísticamente significativas. Por lo que el método de filtración es más efectivo que el método de Ritchie.

***Sensibilidad y especificidad**

Tabla No 12. Pruebas de sensibilidad y especificidad para muestras positivas en muestras inoculadas de parásitos muestra filtración y Ritchie. Tabla 2x2.

Ensayo estudiado	Filtración			Ritchie		
	Presente	Ausente	Total	Presente	Ausente	Total
Positivo	95	1	96	93	-	93
Negativo	1	3	4	6	1	7
Total	96	4	100	99	1	100

De la Tabla 12 del método de filtración la sensibilidad es del 98.95 %, por lo que la ley dice que si la sensibilidad es mayor o igual a 95% el método analítico tiene buena sensibilidad en encontrar e identificar el analito. La especificidad es del 75 %. El valor predictivo positivo es de 98.95 por lo que si VPP es mayor de 95 el método analítico tiene buen valor predictivo positivo. El valor predictivo negativo es de 75 %. El método de Ritchie la sensibilidad es del 93.93 % y la especificidad es del 1 %.

La sensibilidad del método detecta parásitos como: ***Entamoeba histolytica***, ***Giardia lamblia***, ***Balantidium coli***, entre los comensales están: ***Entamoeba coli***, ***Endolimax nana*** y entre los helmintos están: ***Ascaris lumbricoides***, ***Hymenolepis nana***, ***Hymenolepis diminuta***, ***Trichuris trichiuria***, entre otros.

*Reproducibilidad

Tabla No 13. Resultado pruebas positivas en los métodos filtración y Ritchie para muestras inoculadas con parásitos y muestras naturales en los mercados A,B,C. N=80

Método/muestras	A	B	C	Total Muestras positivas	Total Muestras negativas	X	S	CV
Ritchie	12	13	13	38	2	12.66	0.57	0.04
Filtración	11	13	12	36	4	12.00	1.28	0.10
Total	23	26	25	74	6			

Mercado A. La Tiendona, Mercado B Central, Mercado C San Miguelito

Se tomaron tres muestras de los mercados A,B,C el objetivo no es comparar las tres grupos, sino que se presenta reproducibilidad entre las muestras. Según la norma los coeficientes de variación son menores a 15%. En ambos métodos se detecta la presencia y cuantificación de parásitos.

Tabla No 14. Frecuencia de muestras positivas encontradas en cilantro y lechuga en comparación con el método Filtración y Ritchie. n 40

	Cilantro +	%	Lechuga +	%	Total
Ritchie	10	52.63	11	52.38	21
Filtración	9	47.36	10	47.61	19
Total	19		21		40

El método filtración detecta el 47 % muestras positivas a cilantro y el de referencia 52 % , de lechuga el de Ritchie detecta 52 % y el filtración el 47 %.

En un estudio de aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el diagnóstico de parásitos intestinales y comparándola con la validación, se encontró que la sedimentación espontánea encontró un 50 % de los parásitos en sus muestras. **(28)**. En un estudio piloto de detección de parásitos en frutas y hortalizas expandidas en los mercados públicos y privados de la ciudad de Bogotá encontraron presencia de parásitos intestinales en un 48 %. Concluyendo que el 80 % de positividad se encontró en las hortalizas y el 20 % en las frutas.**(5)**.

En la ciudad Bolivar se encontró que en 4 supermercados y 5 mercados populares de un total de 102 muestras una prevalencia de 53.9 % de parásitos intestinales en muestras de lechugas, reportando protozoarios mas frecuentes que helmintos. **(9)**

*Lineabilidad

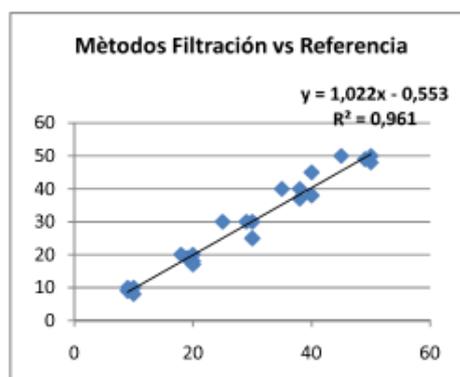


Figura 1. Resultado muestra de análisis de método de filtración versus referencia. n100

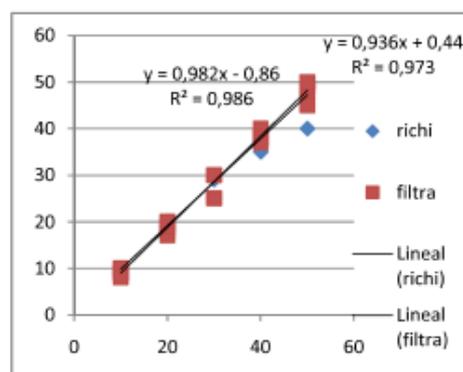


Figura 2. Resultado muestra de análisis de método de filtración versus referencia. n100

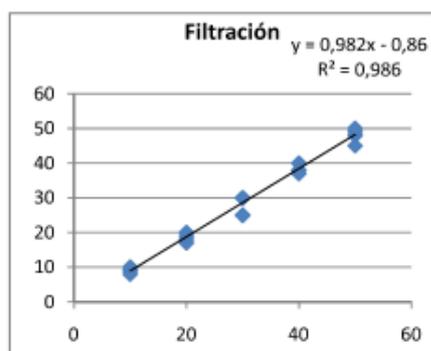


Figura 3. Resultado muestra de análisis de método de filtración. n100

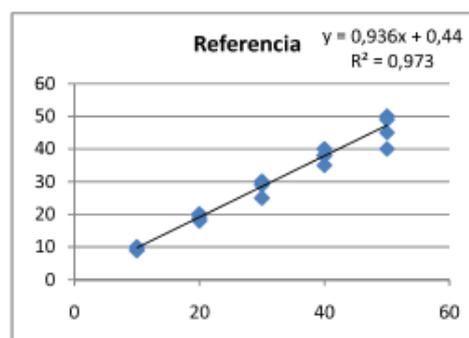


Figura 4 Resultado muestra de análisis de método de referencia. n100

Fig 1. Linealidad entre los métodos de validación y referencia.

La figura 1 indica que en las muestras inoculadas la detección de los parásitos presenta una correlación positiva. El coeficiente de correlación lineal fue de $r = 0.961$ lo que indica una correlación muy fuerte estadísticamente y no se relaciona por casualidad y mide el grado de asociación entre las dos variables.

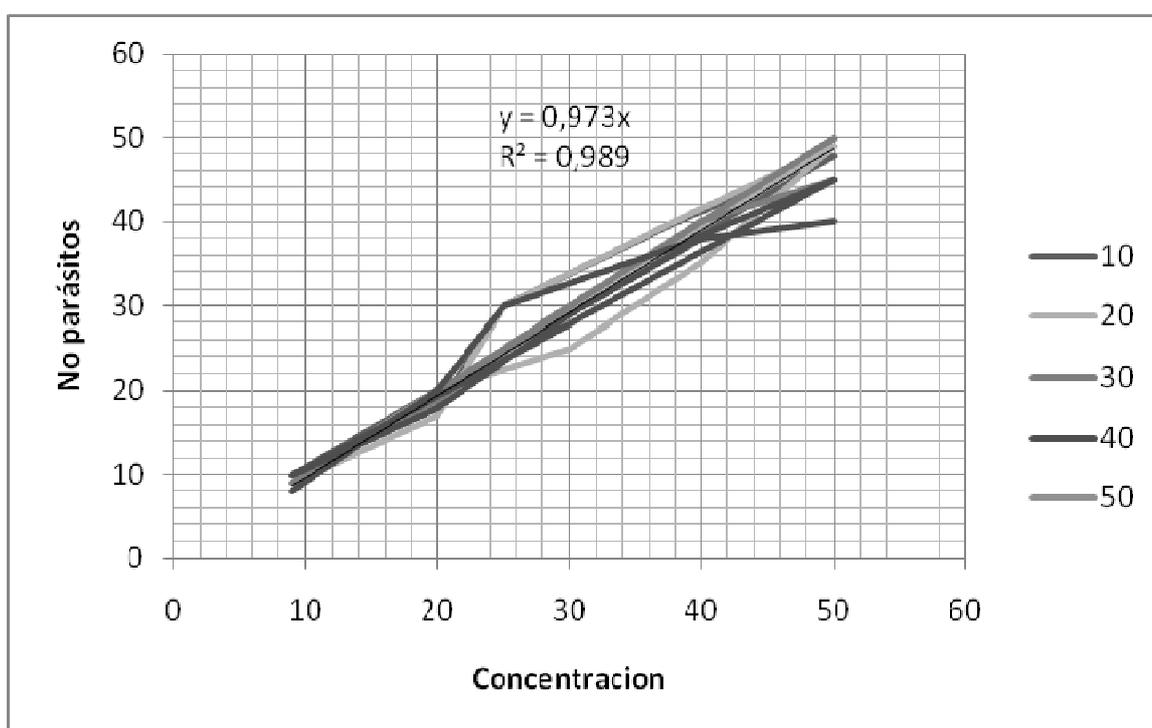


Fig. 2. Concentración de parásitos en 10, 20, 30, 40 y 50 por recuperación utilizando el método filtración y método de Ritchie. (Ver anexos)

En la figura anterior se observa que a las concentraciones de 10 a 50 parásitos en 30 ml de agua destilada, se obtiene una grafica lineal que es directamente proporcional a la concentración del analito, con un $r=0.989$.

***Precisión**

Tabla No 15. Prueba de precisión del método de filtración en filtros de 2,6 y 10 micras en 5 repeticiones. N=15

Filtros	Media	Desviación standard	Varianza	Coefficiente de variación	Total
2 micras	9.8	0.44	0.19	1.93	5
6 micras	3.0	0.70	0.49	16.3	5
10 micras	0.6	0.34	0.11	18.33	5

De la Tabla 15 se tiene que el coeficiente de variación en los tres tipos de filtros, el que presentó menor variación fue el de 2 micras, el criterio de aceptación es el que tenga menor CV a 15% es más preciso, en nuestro caso fue el de 2 micras con 0.04. Por lo que se puede inferir que filtros menores de 2 micras pueden detectar mayor cantidad de parásitos.

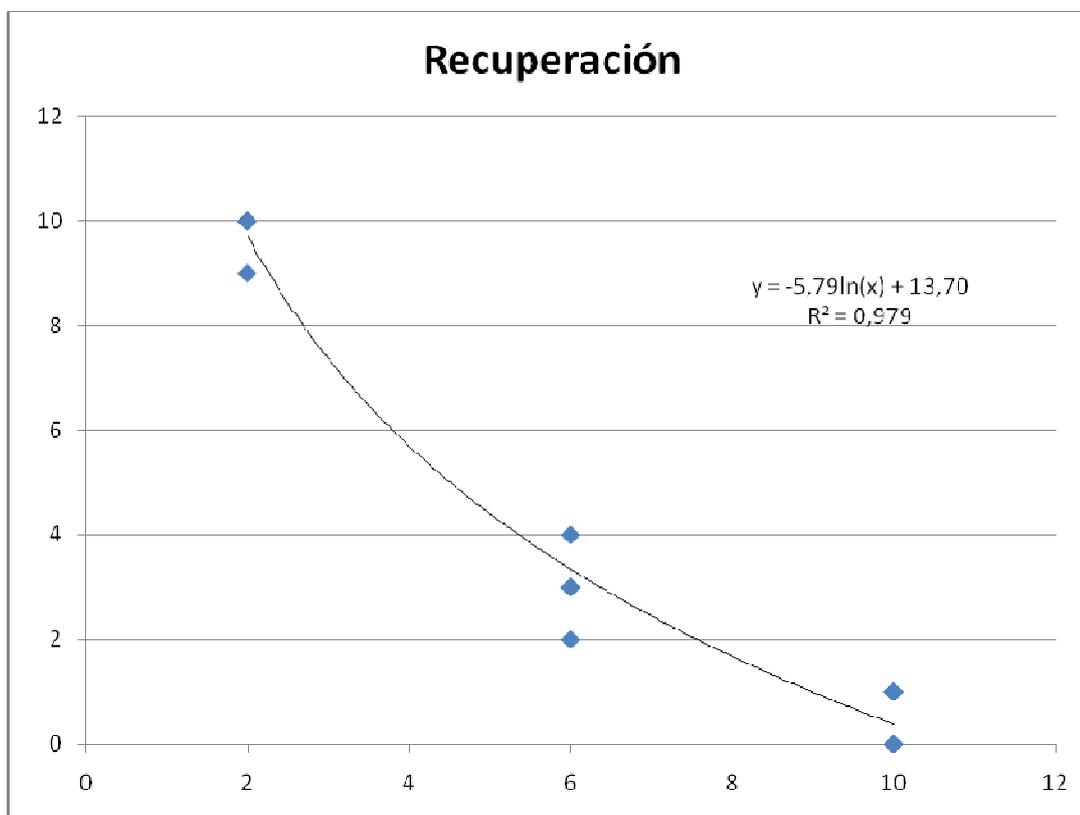


Figura 5. Prueba de precisión utilizando varios filtros de 2,6 y 10 micras.

De la figura 5 se puede extrapolar que filtros menores de 2 micras hay mayor retención de parásitos, es decir entre menos sea el diámetro del poro más casos de parásitos pueden detectarse o cuantificarse.

Tabla No 16 ANOVA para análisis de varianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
tra	227,733333	2	113,866667	341,6	2,645E-11	3,88529383
error	4	12	0,33333333			
Total	231,733333	14				

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
2m	5	49	9,8	0,2
6m	5	15	3	0,5
10m	5	3	0,6	0,3

prueba de LSD
(diferencia mínima
significativa)

<i>Grupos</i>	<i>Promedio</i>
2m	9,8 A
6m	3 B
10m	0,6 C

dms 0,56256705
t 2,17881283

La tabla anterior indica que el valor calculado es mayor que el valor tablas por lo tanto se descarta la hipótesis nula y se acepta la hipótesis experimental y se determina que si existe diferencia entre las medias del diámetro de los poros.

Tabla No 17. Resultado de muestras de análisis por los métodos referencia/filtración de muestras crudas de hortalizas. Método cualitativo. n=80

Numero de muestra	Muestras naturales n 40	Muestras Inoculadas n 40	Nombre parásito en muestras naturales
1	Negativo	Presente	
2	A	Presente	<i>Balantidium coli</i>
3	B	Presente	<i>Entamoeba histolytica</i>
4	C	Presente	<i>Entamoeba coli</i>
5	B	Presente	<i>Entamoeba coli</i>
6	C	Presente	<i>Trichuris trichiura</i>
7	C	Presente	<i>Trichuris trichiura</i>
8	A	Presente	<i>Entamoeba histolytica</i>
9	B	Presente	<i>Trichuris trichiura</i>
10	C	Presente	<i>Entamoeba histolytica</i>
n			

Mercado A . La Tiendona, Mercado B Central, Mercado C San Miguelito

De las muestras inoculadas con parásitos a las hortalizas el 100 % los resultados fueron positivos a cualquier parásito. El mercado B presentó mayor parásitos seguido de A y C. El parasito que predominò mas fue la *Entamoeba*

histolytica* y *Trichuris trichiura fueron los más frecuentes, seguido de ***Ascaris lumbricoides*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli*.**

En un estudio en Bolívar Venezuela encontraron que la contaminación fue más en lechugas en mercados populares y supermercados de la ciudad Bolívar, encontrando un 53 % de muestras positivas. (10). El estudio de Muñoz encontró que la cebolla verde, la acelga y el berro presentaron 100 % de contaminación, además encontraron una alta contaminación por enteroparasitos de hortalizas comercializadas en los mercados de la ciudad de La Paz, Bolivia, los siguientes parásitos: ***Blastocystis hominis* 21.6 %**, ***Balantidium coli* 7.1 %**, ***Endolimax nana* 2.3 %**, ***Giardia sp* 0.6 %**, ***Ascaris sp* 7.3 %**, ***Faciola hepática* 0.4 %** entre otros. (11)

5.2 Método cualitativo.

Tabla 18. Resultado método cualitativo de validación por filtración en muestras inoculadas.

Ensayo estudiado	Filtración		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	94	1	95
Negativo	2	3	5
Total	96	4	100

***Adecuabilidad.**

Se verificó por análisis de laboratorio que el pool de parásitos que se utilizó, corresponde a género y especie de protozoarios y helmintos por clasificación taxonómica.

***Selectividad.**

La selectividad fue de 41.76, por lo que si x^2 calculado es mayor que x^2 tablas, el método analítico tiene buena selectividad.

***Sensibilidad y Especificidad.**

La sensibilidad es de 97.91 %, lo que indica que si la sensibilidad es mayor del 95 % se dice que tiene el método buena sensibilidad de detectar los parásitos y La especificidad es de 75%.

***Valor predictivo positivo y negativo del método.**

El valor predictivo positivo es de 98.94 %, lo que indica que si VPP es mayor de 0.95 indica que el método analítico tiene buen valor predictivo positivo. El valor predictivo negativo fue de 60 %.

***Confiabilidad diagnóstica.**

La confiabilidad diagnóstica es de 0.99, lo que indica que si es mayor de 0.95 el método analítico tiene buena confiabilidad diagnóstica para detectar un posible falso negativo.

***Eficacia.**

La eficacia fue de 97, lo que indica que si es mayor de 95 el método tiene buena eficacia.

***Limite de detección.**

Se hizo dos diluciones de 10 ml y 30 ml. La de 10 ml en 5 repeticiones del pool de parásitos.

Tabla 19. Hoja de cotejo. Método de filtración al vacío en muestras naturales inoculadas con parásitos intestinales en filtro de 2 micras en 10 ml y 30 ml de agua destilada. Análisis Cualitativo.

		10 ml				
No filtro	Nombre del parásito	1	2	3	4	Presente/ausente
1	<i>Ascaris lumbricoides</i>	3	3	3	1	presente
2	<i>Entamoeba histolytica</i>	2	2	4	1	presente
3	<i>Ascaris lumbricoides</i>	4	4	2		presente
4	<i>Trichuris trichiura</i>	2	3	4	1	presente
5	<i>Trichuris trichiura</i>	2	2	3	2	Presente
		30 ml				
1	<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	3	4		presente
2	<i>Hymenolepis nana</i>	2	1	4		presente
3	<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	2	1		presente
4	<i>Endolimax nana</i>	2	1	4		presente
5	<i>Entamoeba coli</i>	1	2	1		Presente

En la Tabla 19 es detectable la presencia de parásitos en las muestras inoculadas. Por lo que se concluye que en ambas concentraciones de volumen está presente el analito, y que a menor volumen la recuperación es mayor.

Tabla 20. Resumen resultado de validación del método de filtración por método cuantitativo y método cualitativo.

Parámetro	Requisito de validación
I Análisis Método Cuantitativo	
Exactitud	Superior gl 78 valor Tc 2.60 y valor de Tt 1.97. Hay diferencias estadísticas.
Sensibilidad	Superior a 98.0%. Expresado como > 95%
Especificidad	Superior a 75%
Precisión	Inferior a 1.93. Expresado como coeficiente de variación.
Repetitividad	A 10 repeticiones no hay diferencias significativas.CV menor 0.15 %
Reproducibilidad	Inferior a 0.04. Expresado como coeficiente de variación. No debe exceder del 20%
Limite de cuantificación	Intervalo en límite inferior a 10 ml detecta 1 a 10 parásitos.
Linealidad	Inferior a $r=0.986$ Expresado como coeficiente de correlación lineal.

Robustez	Inalterable a cambios de variación. Se detecta de 1 a 10 parásitos.
II Análisis Método Cualitativo	
Adecuabilidad	Expresada por clasificación taxonómica que corresponde a genero y especie.
Selectividad	Superior a 41.76. Expresado como chi calculado mayor que chi tablas.
Sensibilidad	Superior a 97.91 %. Expresado como mayor a 0.95
Especificidad	Superior a 75 %.
Valor predictivo prueba positiva	Superior a 98.94. expresado como mayor a 0.95
Valor predictivo prueba negativa	Superior a 60 %
Confiabilidad diagnostica	Superior a 99 %. Expresado como mayor de 0.95.
Limite de detección	Resultado detectado el analito. Superior a 96%. No necesario cuantificar.
Eficacia	Superior a 97 %. Expresado como mayor de 0.95.

Entre las ventajas del método de filtración al vacío están: la rápida filtración, concentración y detección de parásitos, los reactivos son baratos y accesibles, solo se necesita agua destilada en contraste a otros métodos usan mas reactivos, se pueden procesar grandes volúmenes, se pueden procesar varias muestras, se pueden

encontrar mayor número de especies de parásitos, es sencilla la prueba, no se necesitan habilidades y destrezas en el proceso del método, no se deforman los parásitos, es muy útil el método para el procesamiento de muestras biológicas y naturales, no es explosivo.

Tabla 21. Resumen ventajas y desventajas al utilizar el método de filtración al vacío y el método de Ritchie.

Características	Método de Filtración	Método de Ritchie
Tiempo resultado	Corto	Alto
Concentración	Alto	Alto
Reactivos método	Un reactivo	Más de 3
Toxicidad	Nulo	Alto
Manipulación	Sencilla	Técnico especializado
Costo	Bajo	Alto
Muestra	Volumen	Sólido
Método	Sencillo	Habilidades y destrezas
Uso	Análisis hortalizas	Adaptado
inflamable	No	Si
Manipulación	Fácil	Difícil
Identifica formas	Si	Si

Preciso	Si	Si
Confiable	Si	Si
Material	Filtro, placas de petri, beaker, pincel, pipetas pasteur láminas, laminillas.	Tubos de centrifuga, beaker, laminillas, laminas,
Equipo	Filtración al vacio	Centrifugadora
Uso filtro	Si	No
Preparación	Fácil	Habilidades y destrezas
Pasos	7	10
Uso microscopio	Si	Si
Sensibilidad	Alta	Alta

CAPITULO VI

DOCUMENTOS DE VALIDACION

6. 0 DOCUMENTOS DE VALIDACION.

PROCOLO DE VALIDACION

Preparado por: Responsable de validación.

DR. ANTONIO VASQUEZ HIDALGO

Revisado por: Asesores de validación

MSc RAFAEL ANTONIO CEDILLOS

MSc GILBERTO ASCENCIO ALEMAN

LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLOGICO

CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO EN SALUD

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

2011

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 4 De: 58
Título: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

Contenido:**Introducción.****2. Objetivos****3. Marco teórico.****4. Diseño metodológico.****4.1 Tipo de estudio****4.2 Área parte experimental****4.3 Análisis de datos****4.4 Validación de métodos microbiológicos obtenidos según el nuevo método****4.5 Criterios de evaluación según guía de validación de métodos microbiológicos por la AOAC. (ASOCIACION OFICIAL DE QUIMICOS ANALISTAS)****4.5.1 Exactitud****4.5.2 Precisión.****4.5.3 Repetitividad**

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 8-21 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

4.5.4 Reproducibilidad**4.5.6 Falsos negativos y positivos****4.5.7 limite de detección.****4.5.8 Confianza diagnóstica**

Objetivo.

El objetivo del protocolo es desarrollar y validar método de filtración para demostrar cualitativamente/cuantitativamente la detección e identificación de parásitos en muestras de hortalizas.

1. Lugar de estudio.

Se realizó en la sección de parasitología de CENSALUD y laboratorios de control de calidad microbiológica Universidad de El Salvador, así como en laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina.

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 3 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

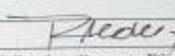
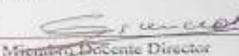
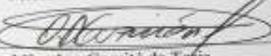
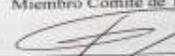
3. Miembros de tesis.

Lo conforman miembros asesores directores, miembros comité de tesis y coordinadoras de maestría en Microbiología e Inocuidad de alimentos.

HOJA DE APROBACION ANTEPROYECTO DE TESIS

Desarrollar y Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.

COMITÉ DE TESIS

Msc. Rafael Antonio Cedillos		Miembro Docente Director
Msc. Gilberto Ascencio Aleman		Miembro Docente Director
Msc. Andres Rivas		Miembro Comité de Tesis
Msc. Oscar Guzman Julian		Miembro Comité de Tesis
Msc. Francisco Merino		Miembro Comité de Tesis

COORDINACION DEL PROGRAMA

Msc. Coralía de los Angeles Gonzalez		Coordinadora Maestría
Msc. María Evelyn Sanchez de Ramos		Coordinadora Maestría
Dr. Antonio Vásquez Hidalgo		Estudiante

Fecha de entrega: Febrero 2011

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 21 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

4. Tipo de Muestra

Se utilizó un inoculó de 1 ml conteniendo un aproximado de 10 parásitos proveniente de muestra fecal. En las que se procedió a inocular en 30 ml de agua destilada, luego en muestras crudas de hortalizas de lechuga y cilantro.

5. Material y equipo.

Reactivos

Agua destilada estéril
Solución Salina Normal 0.85 %
Lugol para parásitos

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 44 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

6. Cristalería y otros.

Pipetas pasteur	5
Beaker 600 ml	5
Bolsas plásticas estériles	40
Filtro de 2 micras	40
pinza	1
Porta y cubreobjetos	Numero suficiente
Cajas de petri	5
kitasato	1

Equipos

Equipo Filtración al vacio	1
Microscopio compuesto	1
Balanza	1
Centrifugadora	1

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 22 De: 57
Título: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

7. Método de análisis.

-Aplicación

La prueba se realizó por el método de filtración a partir de muestras crudas de hortalizas provenientes de los mercados A,B,C. El método de referencia fue el método de Ritchie. Considerando que los parásitos miden entre 20 a 30 micras, unos se filtran en especial los quistes o huevos, y otros quedan atrapados en la red que son mayores de 30 micras.

-Resumen del método.

Pesar hortaliza y dejar en remojo en 30 ml de agua destilada por dos minutos en bolsa plástica transparente, luego lavar vigorosamente y frotar por varios minutos. De la bolsa recolectar en un beaker de boca ancha el líquido. Si hay muchos grumos lavar con gasa doblada en 4 en embudo Buchner del equipo de filtrado al vacío o Beaker sujeta con hule alrededor de boca del embudo.

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 36 De: 57
Título: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

No usar stomacher. Del líquido obtenido filtrar todo con 10 ml en cada recambio con papel filtro No 2 de 2 micras recortar a un diámetro circunferencia de 4,5 cm, colocarlo en aparato de filtración al vacío, presionar una vez el botón de bomba tan rápido para el inicio de succión hasta que volumen de agua llegue al límite superficie del filtro (si no tiene aparato de vacío usar filtración por gravedad con filtro rápido usando un embudo de vidrio y recolectar en un Elenmeyer por el tiempo que sea necesario hasta filtrar). Total de filtros usados son tres. Si filtro esta muy sucio o obstruido agregar 5 ml de agua destilada al embudo sin retirar filtro hasta aclarar. Luego presionar otra vez el botón para succionar. Retirar filtro con pinza y colocarlo con la superficie hacia arriba en una caja de petri e inclinar o un matraz Erlenmeyer de vidrio estéril agregando 0.50 ml de agua destilada o solución salina 0.85 % con pipeta pasteur al centro del filtro.

Con pincel estéril arrastrar y lavar la superficie del filtro desde el centro de caja de petri o del matraz Erlenmeyer hacia el borde. Si usó Erlenmeyer colocar en

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 36 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

vortex o agitador a velocidad de 4, sujetándolo por dos minutos. Con una pipeta pasteur examinar y aspirar todo el líquido y colocar una gota y transferirlo a un portaobjetos y examinar en microscopio a 10 x con diafragma hacia abajo para detectar huevos y larvas y 40 x para identificar quistes. Hacer 3 a 5 láminas por filtro.

Marcha.

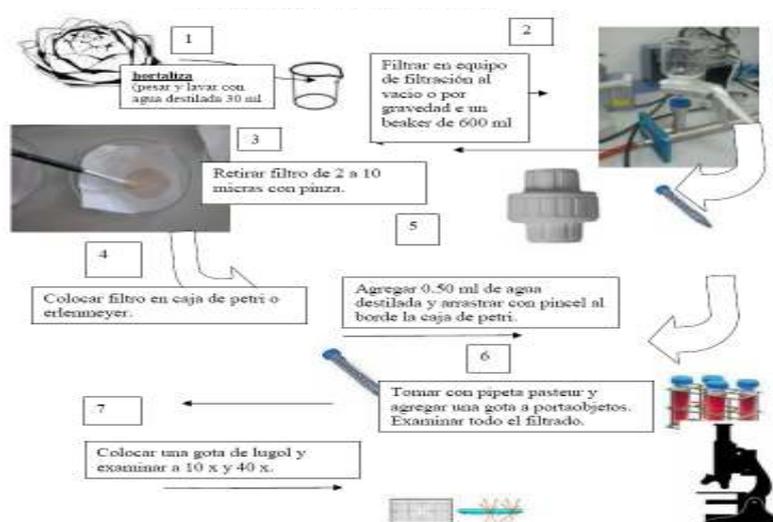


Fig. 3. Método de filtración

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 38 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

8. Precauciones

-Seguridad

- Utilizar gabacha blanca
- Guantes
- Mascarilla
- Sanitizar el área antes y después de usarlo
- Lavarse las manos adecuadamente con agua y jabón.

- Precauciones del método.

- Trabajar en Área estéril
- Cuidado con las muestras por parásitos, no llevarse las manos a la boca.
- Usar los reactivos, solución salina y lugol a concentraciones adecuadas.

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 22 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

9. Parámetros de validación

Según los Criterios de evaluación según guía de validación de métodos microbiológicos por la AOAC. (ASOCIACION OFICIAL DE QUIMICOS ANALISTAS) Limite de detección, precisión. Repetitividad, Reproducibilidad, Falsos negativos y positivos, sensibilidad y especificidad, linealidad, robustez entre otros.

Estudio de Parámetros.

-Límite de detección. Objetivo: Determinar la mínima presencia cualitativa del parásito en las muestras naturales, bajo condiciones experimentales según protocolo. Se hizo evaluación cualitativa.

.Criterio de aceptación: Encontrar algún parásito en las muestras se toma como muestra positiva a parásitos en muestras crudas de hortalizas.

.Procedimiento: Un analista realiza el método descrito en protocolo a validar y el método de referencia, luego se comparan resultados de detección de parásitos.

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 29 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

Interpretación: Es la dilución mas baja que el método pueda detectar la presencia de parásitos en las muestras de hortalizas que es de 1 a 10 parásitos se considera positiva la muestra.

-Precisión.

Objetivo: Determinar la variabilidad mínima del método a validar por medio de análisis estadístico del coeficiente de variación y repetibilidad. Criterio de aceptación $CV < 1 \%$.

Criterio de aceptación: Si al repetir la muestra por los analistas se obtienen resultados similares.

Procedimiento: Un analista realiza 10 repeticiones una muestra de 40, se procede a cualificar el método de filtración.

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 29 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

-Exactitud

Objetivo: Determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos. Se utiliza la t de Student.

.Criterio de aceptación: no exista diferencias significativas en ambos métodos, para alfa igual a 0.05, n-1 grados, t experimental debe ser menor a t tablas.

.Procedimiento: Se procede según protocolo, en que un analista realiza el método a validar en muestras de hortalizas.

-Repetitividad.

Objetivo: Determinar las variaciones según repetición de muestras

.Criterio de aceptación: no exista diferencias significativas.

.Procedimiento: según método descrito protocolo.

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 32 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

-Sensibilidad

Objetivo: Capacidad que tiene el método de detectar parásitos.

.Criterio de aceptación: Detectar parásitos por el método a validar.

.Procedimiento: según protocolo.

-Especificidad

Objetivo: Capacidad que tiene el método de detectar a las muestras con parásitos en muestras crudas de hortalizas.

Criterio de aceptación: CV < 1 %.

.Procedimiento: dos analistas realizan el método en una misma muestra la repetición.

-Precisión: Reproducibilidad

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 32 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

Objetivo: Determinar la viabilidad máxima del método a validar y la variabilidad de los analistas en una muestra por medio del análisis del coeficiente de variación de la reproducibilidad.

.Criterio de aceptación: CVr < 1 %.

.Procedimiento: dos analistas realizan la repetición de una misma muestra según protocolo establecido.

-Falsos negativos y positivos

Objetivo: Determinar la capacidad del método de identificar artefactos que no corresponden a parásitos.

.Criterio de aceptación: ausencia de artefactos.

.Procedimiento: en las muestras crudas inoculadas con parásitos 1 ml luego recuperar con el método al menos un parásito intestinal.

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 35 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

-Robustez.

Objetivo: Introducir variables no definidas del método para observar cambios en el método.

Procedimiento: Se sometió a cambios de pH, uso de stomacher, uso de rpm a diferentes gravedades.

Criterio de aceptación: exista límite de detección ya definida por método cualitativo y la prueba detecta parásitos.

10. Esquema de trabajo.

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 40 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

-Preparación del inoculo.

Para las muestras artificialmente contaminadas se prepara un pool de 1 ml conteniendo en promedio 10 huevos de: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y cestodos como de *Taenia sp*, o en su efecto en promedio 10 quistes de: *Entamoeba coli* y *Entamoeba histolytica* a partir de heces fecales positivas a parásitos preservadas en formol. Se hacen 10 repeticiones de cada uno en total serán 100 muestras solo de las repeticiones. Luego se inocularan a muestras de hortalizas por separado e individual cada parásito y se espera recuperar un numero en promedio de 1 a 10 en cada hortaliza inoculada según parásito. Se considera positivo resultado si se recupera en promedio 10 parásitos de cualquier especie por repetición. Para obtener un pool de parásitos de la misma especie, se procede primero a tener un volumen de muestras de heces positivas a parásitos, luego por el método de Ritchie se procede a obtener una concentración de parásitos, luego se examina por el microscopio a 10 x sin cubreobjetos con solución salina 0.83 % , se identifica el parásito y con una pipeta pasteur se aspira y se coloca en un recipiente de vidrio la cantidad necesaria del parásito y se clasifica por especie, luego por cada ml se tienen de 10 parásitos.

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 35 De: 57
Título: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

Luego se procede a agregar al agua destilada 1 ml del parásito y se procede a filtrar por gravedad o por filtración al vacío utilizando un filtro menor o igual a 2 micras para recuperar el número de parásitos y se hace recuento de recuperación.

INFORME TECNICO DE VALIDACION

11. Informe técnico

Objetivo: Presentar resultados del proceso de validación por filtración en las muestras crudas de hortalizas, utilizando un filtro de 2 micras.

Tipo de validación: Validación concurrente.

Referencia del protocolo.

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 31 De: 57
Título: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

El método ha sido verificado por los analistas de acuerdo al protocolo en particular.

Datos sobre calificación del equipo.

Los equipos utilizados están en buenas condiciones, microscopio. .

Resultados.

12. Evaluación de resultados por análisis estadísticos.

Parámetro	Especificación	Resultado	Conclusión
Precisión	CV < 1 %	0.002 %	Aceptable
Repetibilidad del método.	CV < 1 %	0.002 %	Aceptable
Reproducibilidad Analista 1	CV < 1 %	0.002 %	Aceptable

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 26 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

Los estudios realizados con el método de filtración, los resultados de pruebas en la precisión es aceptable con relación al coeficiente de variación menor de 15 %.

El valor t Student indica que los resultados son menor que la t tabla, por lo que se considera que el método cumple con uno de los parámetros, como es el de exactitud.

Los parásitos inoculados en muestras crudas de hortalizas y muestras naturales nos indican que el método de filtración detecta los parásitos en las muestras crudas.

No se detectaron otros microorganismos, e incluso los artefactos son en menor cantidad que los observados en muestras de heces, por lo que el método de filtración se considera aceptable con la exclusividad del método.

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 28 De: 57
Titulo: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

En las pruebas realizadas por los analistas, indican que los resultados son aceptables ya que permite identificar cualitativamente los parásitos en los frotis realizados a partir de las muestras inoculadas y naturales.

En el caso del analista, se procedió a identificar por claves, resultando que en el 50 % de las muestras fueron inoculadas y el otro 50 % fueron naturales, encontrando que las muestras inoculadas en el 70 % identificaron las positivas y en las muestras naturales en un 28 %.

En el caso de la selectividad si X_i calculada es mayor que X_i de tablas se concluye que para el nivel de confianza que se ha seleccionado, el método

Laboratorio Control de Calidad Microbiológico CENSALUD-UES	Procedimiento normalizado de trabajo	Numero 1
		Pag 31 De: 57
Título: Validar método de filtración para la detección de protozoarios y helmintos en muestras crudas de hortalizas.		Departamento: Control de Calidad Microbiológico
Fecha de Elaboración: Febrero 2011	Revisión No 1	Copia No 1

Analítico tiene una selectividad que diferencia los verdaderos positivos de los verdaderos negativos.

En la sensibilidad y especificidad se espera que para que el método sea válido estadísticamente, la sensibilidad y la especificidad debe ser mayor del 0.95 %.

Para la confiabilidad diagnóstica si $P(G/T)$ mayor de 0.95 el método analítico tiene buena confiabilidad diagnóstica para detectar correctamente el analito estudiado.

En el caso del coeficiente de variación no debe haber mayor variabilidad o dispersión de los datos con respecto al de referencia. Por ANOVA la f calculada debe ser mayor que f tablas para que exista diferencias estadísticamente significativas.



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

CENSALUD

Ciudad Universitaria
Final 25 avenida norte
San Salvador El Salvador

CERTIFICADO DE VALIDACION

CONCLUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método de filtración en las muestras crudas de hortalizas **CUMPLE CON LAS ESPECIFICACIONES ESTABLECIDAS EN EL PROTOCOLO DE VALIDACION**. Por esta razón se da por **VALIDADO**.

MSc. Rafael Antonio Cedillos _____

Asesor Director

MSc Gilberto Ascencio Alemán _____

Asesor Director

Responsable de Validación:

Dr. Antonio Vásquez Hidalgo _____

CIUDAD UNIVERSITARIA SAN SALVADOR, 2011

CAPITULO VII
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El método de filtración es más efectivo que el método de Ritchie en la detección de huevos de helmintos y quistes de protozoarios en muestras inoculadas y hortalizas contaminadas experimentalmente en el laboratorio.

Ambos métodos el de filtración y el método de Ritchie identifica formas parasitarias de huevos de helmintos y quistes de protozoarios en muestras inoculadas y hortalizas contaminadas experimentalmente en el laboratorio.

La validación del método de filtración no difiere cualitativamente del método de Ritchie en la detección de parásitos.

Los resultados indican que el método de filtración en comparación con el método de Ritchie hay diferencias estadísticamente significativas.

La sensibilidad del método de filtración y Ritchie detectan cualitativamente y cuantitativamente parásitos como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* y entre los helmintos: *Ascaris lumbricoides*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *Trichuris trichiuria*.

El coeficiente de correlación lineal indica hay una correlación muy fuerte estadísticamente y no se relaciona por casualidad por lo que mide el grado de asociación entre las dos variables.

En filtros menores de 2 micras hay mayor retención de parásitos, por lo que entre menos sea el diámetro del poro más casos de parásitos pueden detectarse o cuantificarse. Por lo que se puede inferir que filtros menores de 2 micras pueden detectar mayor cantidad de parásitos.

No hay mayor dispersión de datos entre un método de filtración y el método de Ritchie entre las medias, porque lo que cumple la norma de CV sea menor de 15%.

El análisis estadístico aplicado a los métodos de filtración y método de Ritchie confirma que hay diferencias estadísticas, por lo que el método de filtración es más efectivo que el método de Ritchie en condiciones experimentales.

CAPITULO VIII

RECOMENDACIONES

8. RECOMENDACIONES

- Utilizar las medidas de bioseguridad en la manipulación de las muestras de hortalizas, como el uso de guantes y mascarilla, para la detección de parásitos.
- Promover el uso del método de filtración con filtros menores o iguales a 2 micras de celulosa, en muestras de hortalizas, como diagnóstico preliminar y definitivo de parasitosis.
- Utilizar los pasos en orden del método de filtración en forma correcta para hacer el diagnóstico de parásitos en las muestras crudas de hortalizas.
- No diluir mucho con agua destilada para el lavado de las muestras en bolsa plástica. Usar las concentraciones del volumen del método.
- Usar el orden correcto de los reactivos en el método de filtración.
- Utilizar agua destilada no contaminada.
- Esterilizar los pinceles y las pipetas Pasteur. El pincel debe ser recto, recortado, no absorbente de cerdas de nylon.
- Utilizar filtros menores de 2 micras para encontrar huevos, quistes y adultos de protozoarios y helmintos

- Se compare el método de filtración al vacío con otros métodos de laboratorio.
- Se recomienda utilizar el método de filtración para detectar parásitos en laboratorios especializados de inocuidad de alimentos.
- Los filtros deben ser de celulosa y rápidos de marca comercial y que cumplan el diámetro menor de 2 micras.
- El método de filtración es un método innovador que puede ser utilizado para detectar huevos de helmintos y quistes de protozoarios en muestras de hortalizas en un laboratorio de inocuidad de alimentos.

BIBLIOGRAFIA

1. Álvarez M; Colina M; Rodríguez H. 1981. Recuperación de formas evolutivas de enteroparásitos en legumbres del mercado Las Pulgas de Maracaibo, Venezuela. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela: no 14
2. Andrea N. et al 2006. Estudio piloto de detección de parásitos en frutas y hortalizas expandidas en los mercados públicos y privados de la ciudad de Bogota D.C. (en línea) 2006. Disponible en www.unicolmayor.edu.co
3. Manual de Diagnostico Parasitológico. 2008. Departamento de Microbiología de UES. 154 pp
4. Botero D. 1998. Parasitosis Intestinales por nematodos. 4:282
5. García L. 2001. *Diagnostic Medical Parasitology*, 4 ed. ASM Press. 23 p
6. García L; Brucker J. 1997. *Diagnostic Medical Parasitology*. 3a edition. American Society for Microbiology Washington D.C. U.S.A. 67 p
7. Sun T. 1988. *Color atlas and textbook of diagnostic parasitology*. 1 ed. 90 p.
8. Cartaya, Z et al. 2003. Presencia de *Entamoeba histolytica*, *Ascaris lumbricoides* y *Coliformes totales* en ensaladas para perrocalientes, expandidas en el centro de la ciudad de Maracay. *Rev Soc. Microbiol. ene.* 2003.
9. Devera R. et al. 2006. Parásitos intestinales en lechugas comercializadas en mercados populares y supermercados de ciudad

- Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela. Rev. Saoc. Ven. Microbio. V 26 no 2 car. 2006.
10. Monge L; Chinchilla M; Reyes L. 1995. Presencia de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen crudas en Costa Rica.
 11. Muñoz V et al. 2008. Alta contaminación por enteroparasitos de hortalizas comercializadas en los mercados de la ciudad de La Paz, Bolivia. Rev. biofarbo, v16.
 12. Traviezo L et al. 2004. Contaminación enteroparasitaria de lechugas expandidas en mercados del estado Lara. Venezuela. Parasitol Latinoam.59:167-170
 13. Camargo N. et al. 2006. Estudio piloto de detección de parásitos en frutas y hortalizas expandidas en los mercados públicos y privados de la ciudad de Bogotá D.C.:. Universidad colegio Mayor de Cundinamarca.
 14. Rea M. et al. 2004. Existencia de parásitos intestinales en hortalizas que se comercializan en la ciudad de corrientes, Argentina. 2004.
 15. Hernández, A , Cedillos, Rafael A., Dimas, D,. Estudio bacteriológico y parasitológico de muestras de verduras del mercado central de San Salvador. Arch. Col. Med. Vol 24 No 1, enero a marzo 1971
 16. Beaver J. 1986. Parasitología Clínica.. 2 ed.. 251 p
 17. Zinsser et al 1997. Microbiología. 20 ed. 86: 1539
 18. Cuestas I. A. 2006. Validación de métodos Microbiológicos. Protocolo de validación en línea. Consultoría Internacional. FAO. http://www.ric.fao.org/prior/comagric/codex/rla3013/pdf/aseg_10.pdf
 19. Escalona, T et al. Validación de los métodos de laboratorio. 2007. rev. Chil. Tecnolo. Med. 27 (2), p 1387-1394. 2007

20. Guía para la validación y verificación de procedimientos de examen cuantitativos empleados para el laboratorio clínico. México. Abril 2008. 47 p
21. AOAC INTERNATIONAL (1999), en Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation. Journal of AOAC International. V 82, No2 p.1 (13) : 402-415
22. OAA. Organismo Argentino de Acreditación. 2003. Guía para validación de métodos de ensayo. Código DC-LE-05.
23. Ochoa, R y otros. 2000. Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de las vacunas. Centro de Investigación y producción de vacunas. Habana Cuba. 4 p
24. Ruisanchez, I. et al. Analítica, Química. 2002 Acta; 455: 267-275
25. Sánchez, J y otros. 2010. Validación de métodos analíticos no cuantitativos. Vol 41 N 2. En línea. 1-10
26. Serret, F et al. 2002. Validación de los métodos analíticos para la identificación y cuantificación del dexrometorfano. Rev cubana 36 (1) 26-34
27. Koneman E. 1998. Microbiología Médica. Edit panamericana 2 ed. 187 p
28. Pajuelo G. et al. 2006. Aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el diagnóstico de parásitos intestinales.. Rev Biomed 17: 96-101
29. CEPIS / OPS. Porcentajes de parásitos en productos agrícolas según calidad de agua de riego / Productos y servicios de laboratorio. Sin fecha
30. FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. 1997 Validation of analytical methods for food control. Viena. Austria.

31. Figueroa L. et al. 2002 Strongyloides stercoralis. Prevalencia y evaluación del diagnóstico utilizando cuatro métodos coproparasitológicos (en línea) Rev Soc Ven. Microbiología. 2002. Disponible en <http://www.scielo.org.ve/scilo.php>
32. Franjola T; Gutierrez J. 1984. Estudio parasitológico en lechuga y beterragas en la ciudad de Valdivia, Chile. Rev Méd Chile 112: 57-60.
33. Gregorio P. et al. 2008. Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. (en línea) 2008. Rev Perú med. Exp. salud publica. Disponible en <http://www.scielo.org.v>
34. Garcia LS. 1995. Parasitology. Diagnosis of parasitic microbiology procedures Handbook. American Society for Microbiology. 34 p
35. Gaspard P; Schwartzbrod J. 1993. Determination of the parasites contamination of irrigated vegetables. Water science and technology; 27: 295-302.
36. Lombardero Oscar. 1971. Glosario de Términos Parasitológicos. Ed. EUDEBA. Buenos Aires. 59 p
37. Kumar, S. et al. Atlas of Medical Parasitology. 1996 p 78
38. Masson. 1999. Diccionario Médico. Salvat Editores. P 735
39. Murray et al. 2003. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. ASM Press. 8 Ed. 84:837
40. Organización Panamericana de la Salud. 1983. Serie paltex publicación científica no. 439: 119 p
41. Rodríguez Z de; Fonse R; Moreno Y et al. 1998. Detección de parásitos en lechugas distribuidas en mercados populares del Municipio Maracaibo. Kasmera 26 (1): 1-6.
42. Saredi, N. 2002. Manual Practico de Parasitología Médica. 1ª edic. p 112

43. Soledad, B. Productos. Métodos y procesos de validación (en línea). Curso. 2009.
44. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. Instituto Nacional de Salud. No 37 lima Peru. 2003
45. USP. United Status Phamacopeia 31, 2008
46. Valera V. 2007. Presencia de enteroparasitos en lechuga en establecimientos de consumo público de alimentos del distrito de Cercado Lima.
47. World health organization (WHO). 1989. Health guidelines for these of wastewater in agriculture and aquaculture. Technical report series no 778: 36-42

GLOSARIO

Glosario Validación

Adecuabilidad: Consiste en comprobar que los componentes y reactivos involucrados en la obtención de datos funcionen apropiadamente o en su efecto corroborar que el analito este presente y corresponda a la muestra.

Analito: agente, sustancia, sustrato definido en la matriz en un análisis.

Coefficiente de correlación: permite estimar la relación entre dos variables y si los resultados siguen una función lineal.

Confiabilidad diagnóstica: cuando el método sea capaz de detectar correctamente el sustrato de interés.

Concurrente: programa o método que proporciona seguridad de un proceso específico.

Exactitud: capacidad que tiene el método para dar resultados lo mas próximo posible al valor real o es resultado de una medición y el valor verdadero de lo medido.

Especificidad: Capacidad del método de dar negativo cuando las muestras no tienen el analito.

Eficacia: capacidad de un ensayo para detectar correctamente todos los positivos y los negativos.

Falso positivo: probabilidad de que el método de un resultado positivo cuando la muestra no tenga el analito.

Falso negativo. Probabilidad que el método de un resultado negativo cuando la muestra tenga el analito.

Limite de detección: cantidad mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.

Limite de cuantificación: es la cantidad mínima que pueda obtenerse y ser cuantificada. O numero mínimo de microorganismos dentro de una variabilidad definida.

Lineabilidad: Estadísticamente es la relación directa proporcional entre los resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras del estudio.

Método cualitativo: son métodos dicotómicos de diagnostico y para validarlos es necesario comparar el resultado contra una característica de referencia.

Método de referencia: Es el patrón de valares de una propiedad a comparar entre el método de estudio y referencia.

Muestra de control: material de composición similar a las muestras que están siendo analizadas de la matriz.

Precisión: Esta definido en términos de repetibilidad, reproducibilidad. El analito esta considerado como fuente principal. O es el grado de concordancia entre los valores o resultados obtenidos de una serie de repeticiones.

Rango: es el intervalo entre el valor mas superior y el valor mas inferior.

Recuperación: es el cociente entre la cantidad de analito y el contenido en la muestra.

Repetibilidad: método donde se realizan 10 repeticiones o replicas por nivel. O grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas de una matriz.

Reproducibilidad: Se valida con diferentes lotes de cada matriz realiza en diferentes condiciones de medición. O es la capacidad que tiene una técnica de ser reproducida.

Sensibilidad: Capacidad del método de dar positivo cuando las muestras tienen el analito.

Respuesta cualitativa: es un resultado binario del tipo SI/NO, presente/ausente de un determinado analito en una muestra.

Rudeza: Método donde se realizan pequeños cambios en condiciones normales para ver la variabilidad del método en particular.

Robustez: método analítico para permanecer inalterado por pequeños cambios en los parámetros del método.

Selectividad: capacidad que tiene el método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés.

Tablas de contingencia. Tabla de comparación respecto al resultado obtenido mediante un método de referencia o confirmatorio.

Validación: es la validación de un proceso como el medio de asegurar y proporcionar evidencia documentada de que el proceso es capaz de producir consistentemente un producto terminado de la calidad requerida.

Valor predictivo positivo: Es la probabilidad que tiene un individuo de ser realmente positivo, cuando el resultado de la prueba que se le practica resulta es positiva.

Valor predictivo negativo: Es la probabilidad que tiene un individuo de ser realmente negativo, cuando el resultado de la prueba que se le practica resulta ser negativo.

Veracidad: grado de concordancia existente entre la media aritmética de un gran numero de resultados.

ANEXOS.

ANEXO I

Tabla 3. Hoja de cotejo No 1. Recuperabilidad método de filtración al vacío en muestras inoculadas con 10 parásitos intestinales en filtros de 2 micras en 30 ml agua destilada. Análisis cuantitativo. n=100

No filtro	Nombre del parásito	forma	Total inocular	No de lamina					Total recuperación
				1	2	3	4	5	
2 M				1	2	3	4	5	
1	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	3	4	3			10
2	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	5	4				9
3	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	3	1	1	1	9
4	<i>Trichurus trichiura</i>	Huevo	10	3	3	4			10
5	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	3	4			10
6	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	5	5				10
7	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	5	2	3			10
8	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3	1		10
9	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	5	1			10
10	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3	1		10
11	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	5	2			10
12	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	5	4				9
13	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	3	2	2		10
14	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	3	3			9
15	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	3	3			9
16	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	3	4			10
17	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	4	3	3			10
18	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	3	4			10
19	<i>Ascaris lumbricoides</i>	huevo	10	3	3	3			9
20	<i>Ascaris lumbricoides</i>	huevo	10	3	3	3			9
21	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	3	2	2		10

22	Entamoeba coli	Quiste	10	3	3	3			9
23	Giardia lamblia	Flagelado	10	3	3	3			9
24	Trichuris trichiura	Huevo	10	3	3	4			10
25	Ascaris lumbricoides	Huevo	10	3	3	3			9
26	Trichuris trichiura	Huevo	10	3	3	2	1		9
27	Entamoeba coli	Quiste	10	3	3	4			10
28	Entamoeba histolytica	Quiste	10	5	4				9
29	Trichuris trichiura	Huevo	10	4	2	3	1		10
30	Entamoeba coli	Quiste	10	3	3	3			9
31	Entamoeba histolytica	Quiste	10	4	2	1	2		9
32	Uncinaria	Huevo	10	3	3	3			9
33	Entamoeba histolytica	Quiste	10	2	2	2	2	2	10
34	Entamoeba coli	Quiste	10	2	2	2	3		9
35	Entamoeba coli	Quiste	10	3	3	3			9
36	Entamoeba coli	Quiste	10	5	5				10
37	Ascaris lumbricoides	Huevo	10	3	2	3	1		9
38	Entamoeba coli	Quiste	10	3	3	3			9
39	Ascaris lumbricoides	Huevo	10	5	4				9
40	Entamoeba coli	Quiste	10	4	5				9
41	Trichuris trichiura	Huevo	10	5	4				9
42	Entamoeba coli	Quiste	10	5	5				10
43	Uncinaria	Huevo	10	4	2	1	2		9
44	Entamoeba histolytica	Quiste	10	2	2	2	2	1	9
45	Ascaris lumbricoides	Huevo	10	3	3	4			10
46	Trichuris trichiura	Huevo	10	4	4	1			9
47	Ascaris lumbricoides	Huevo	10	4	3	3			10
48	Entamoeba coli	Quiste	10	5	4				9
49	Trichuris trichiura	Huevo	10	3	3	4			10
50	Ascaris lumbricoides	Huevo	10	3	3	3			9
51	Entamoeba histolytica	Quiste	10	3	4	2			9
52	Entamoeba coli	Quiste	10	4	5				9

53	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	3	3			9
54	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	5	4				9
55	<i>Trichirus trichiura</i>	Huevo	10	5	4				9
56	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	3	3			10
57	<i>Giardia lamblia</i>	Flagelado	10	5	4				9
58	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	3	3	3			9
59	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	3	3	1		10
60	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	3	4			10
61	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	5				9
62	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	3	3			9
63	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	3	2	1		9
64	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3			9
65	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	3	2	1		10
66	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3			9
67	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	5	5				10
68	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	5	5				10
69	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3			9
70	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	5	5				10
71	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	5	4				9
72	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3	1		10
73	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	5	5				10
74	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	3	3			9
75	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	5	5				10
76	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3			9
77	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	3	3	1		10
78	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3	1		10
79	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3			9
80	<i>Taenia sp</i>	Huevo	10	5	5				10
81	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3			9
82	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	3	4	3			10
83	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	4	3	3			10

84	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3			9
85	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	4			10
86	<i>Hymelopsis nana</i>	Huevo	10	3	3	4			10
87	<i>Giardia lamblia</i>	Flagelado	10	2	4	4			10
88	<i>Endolimax nana</i>	Quiste	10	3	3	3			9
89	<i>Uncinaria</i>	Huevo	10	5	2	3			10
90	<i>Uncinaria</i>	Huevo	10	3	2	5			10
91	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	4			10
92	<i>Hymenolepis nana</i>	Huevo	10	3	4	3			10
93	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3	1		10
94	<i>Hymenolepis nana</i>	Huevo	10	3	3	3			9
95	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	3	2			9
96	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	4	3	2	1		10
97	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	2	2	2	4		10
98	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	5	5				10
99	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	3	3	4			10
100	<i>Taenia sp</i>	Huevo	10	4	3	3			10

Tabla 4. Hoja de cotejo No 1. Recuperabilidad método de filtración al vacío en muestras inoculadas con 10 parásitos intestinales en filtros de 2 micras en 30 ml agua destilada. Análisis cuantitativo. Método Referencia (Ritchie). n=100

No filtro	Nombre del parásito	forma	Total inocular	No de lamina					Total recuperación
2 M									
1	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	2	3	1	3		9
2	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	1	1	4	4		10
3	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	4	4	1			9
4	<i>Trichurus trichiura</i>	Huevo	10	4	1	3	1		9
5	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	2	4	3			9
6	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3			9
7	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	1	2		9
8	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	2	1	3		9
9	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	4	2			10
10	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	4	2			9
11	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	3	2			9
12	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	3	3			9
13	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	4	1	1		9
14	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	4	2	3			9
15	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	4	2			9
16	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	3	3	1		10
17	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	2	2	4	1		9
18	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	3	3	1		10
19	<i>Ascaris lumbricoides</i>	huevo	10	4	2	3			9
20	<i>Ascaris lumbricoides</i>	huevo	10	4	4	2			10
21	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	3	3			9
22	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	4	4	1			9
23	<i>Giardia lamblia</i>	Flagelado	10	3	3	4			10
24	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	4	2	3			9

25	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	2	3	3	1		9
26	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	3	3	3	1		10
27	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	2	4			9
28	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	4	2	3			9
29	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	4	4	1			9
30	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	4	2			9
31	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	3	3	1		10
32	<i>Uncinaria</i>	Huevo	10	4	3	2			9
33	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	2	4	3			9
34	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	1	3	3	3		10
35	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	1	4	4			9
36	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	2	3	4			9
37	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3			9
38	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	4	3	3			10
39	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	2	3			9
40	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	3	1	2		9
41	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	4	2	1	3		10
42	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	2	4	3			9
43	<i>Uncinaria</i>	Huevo	10	3	3	3			9
44	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	5	4				9
45	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	2	1	2		9
46	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	4	3	3			10
47	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	4			10
48	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	3	2	1	2	9
49	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	4	3	3			10
50	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	1	2	3		9
51	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	4	2	1	2		9
52	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	4	3	2	1		10
53	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	2	2	2		9
54	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	2	3	1		9
55	<i>Trichirus trichiura</i>	Huevo	10	4	1	4			9

56	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	2	2	3	2		9
57	<i>Giardia lamblia</i>	Flagelado	10	3	3	4			10
58	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	4	3	3			10
59	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	4	3			10
60	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	4	2	3			9
61	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	4	2			9
62	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	2	4	4			10
63	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	4	3			10
64	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3			9
65	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	5				9
66	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	5	4	1			10
67	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	4	3	2			9
68	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	3	4	3			10
69	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	2	1		9
70	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	3	3			9
71	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	2	4			9
72	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	3	2			9
73	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3			9
74	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	4	2	3			9
75	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	4	5				9
76	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	3	3			10
77	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	4	3	2	1		10
78	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	2	3			9
79	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	2	3	4			10
80	<i>Taenia sp</i>	Huevo	10	4	3	3			10
81	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	4			10
82	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	4	3	2			9
83	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	2	3	4			9
84	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	2	3	4			9
85	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	2	4	3			9
86	<i>Hymelopsis nana</i>	Huevo	10	3	4	2			9

87	<i>Giardia lamblia</i>	Flagelado	10	3	3	3			9
88	<i>Endolimax nana</i>	Quiste	10	4	3	3			10
89	<i>Uncinaria</i>	Huevo	10	3	3	2	1		9
90	<i>Uncinaria</i>	Huevo	10	4	2	3			9
91	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	3	3			10
92	<i>Hymenolepis nana</i>	Huevo	10	3	4	3			10
93	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	2	3			9
94	<i>Hymenolepis nana</i>	Huevo	10	3	3	3			9
95	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	3	2			9
96	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	4	3	3			10
97	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	5	4				9
98	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	10	4	3	2			9
99	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	3	3	3	1		10
100	<i>Taenia sp</i>	Huevo	10	3	2	3	2		10

Tabla 5. Recuperabilidad método de filtración en muestras naturales inoculadas con 10 parásitos intestinales en filtros de 2 micras en 30 ml agua destilada. Análisis cuantitativo. n=40

Muestras hortalizas inoculadas del pool por filtración al vacío.										
1	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	Lechuga	1	3	4			A	++
2	<i>Hymenolepis nana</i>	Huevo	Lechuga	2	1	4			B	++
3	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	Cilantro	1	2	1			C	+
4	<i>Endolimax nana</i>	Quiste	Lechuga	2	1	4			A	+
5	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	Cilantro	1	2	1			B	+
6	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	Cilantro	2	1	1			C	+
7	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	Lechuga	1	1	2			A	+
8	<i>Uncinaria</i>	Huevo	lechuga	4	4	0			B	+
9	<i>Hymenolepis nana</i>	Huevo	Cilantro	2	1	4			C	+
10	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	Lechuga	1	1	1			A	+
11	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	Cilantro	2	3	1	4		B	+
12	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	Cilantro	2	1	4			C	+
13	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Quiste	lechuga	1	2	4			A	+
14	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	lechuga	5	2	4			B	+
15	<i>Hymenolepis nana</i>	Huevo	Cilantro	1	2	1	1		C	+
16	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	Lechuga	1	4	1			A	+
17	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	lechuga	1	2	1	4		B	+
18	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	Cilantro	2	1	4	4		C	++
19	<i>Uncinaria</i>	Huevo	Lechuga	2	2	2			A	+
20	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	Cilantro	1	1	1	2		B	+
21	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	Cilantro	2	2	2	1		C	+
22	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	Lechuga	1	2	1	2		A	+
23	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	lechuga	2	1	1	2		B	+
24	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	Cilantro	2	2	2	2		C	+
25	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	Lechuga	1	4	2			A	++
26	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	cilantro	1	1	1	2		B	+

27	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	Cilantro	2	1	2	1		C	+
28	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	Lechuga	2	2	1	1		A	+
29	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	lechuga	2	1	2	1		B	+
30	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	Cilantro	2	1	1	1		C	+
31	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	Lechuga	2	1	1	2		A	+
32	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	cilantro	2	1	3	1		B	+
33	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	Cilantro	2	1	2	1		C	+
34	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	Lechuga	2	1	1	1		A	+
35	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	lechuga	2	1	2	1		B	+
36	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	Lechuga	1	2	1	1		A	+
37	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	cilantro	2	1	2	1		B	+
38	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	Cilantro	1	1	2	1		B	+
39	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	Lechuga	1	2	1	1		C	+
40	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Huevo	Cilantro	1	2	1	1		A	+

Tabla 6. Tabla de concentraciones 10,20,30,40,50 por método de filtración y Ritchie.

No filtro	Nombre del parásito	forma	Total inoculo	No de lamina					Total recuperación
				1	2	3	4	5	
2 M									
Concentración de 10 parásitos/30 ml									
1	<i>Áscaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3			9
2	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	4	2	1		10
3	<i>Entamoeba histolityca</i>	Quiste	10	3	3	3			9
4	<i>Taenia</i>	Huevo	10	4	3	2	1		10
5	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	4	3	2			8
Concentración de 20 parásitos/30 ml									
1	<i>Áscaris lumbricoides</i>	Huevo	20	9	5	5	1		20
2	<i>Taenia</i>	Huevo	20	9	9				18
3	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	20	5	5	5	2		17
4	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	20	5	5	5	4		19
5	<i>Entamoeba histolityca</i>	Quiste	20	9	9	2			20
Concentración de 30 parásitos/30 ml									
1	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	30	1 0	1 0	5			25
2	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	30	1 0	1 0	1 0			30
3	<i>Entamoeba histolityca</i>	Quiste	30	1 0	1 0	1 0			30
4	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	30	9	1 0	6			25
5	<i>Áscaris lumbricoides</i>	Huevo	30	1 0	1 0	1 0			30
Concentración de 40 parásitos/30 ml									
1	<i>Taenia</i>	Huevo	40	1 0	1 0	1 0	8		38
2	<i>Áscaris lumbricoides</i>	Huevo	40	1 0	1 0	1 0	1 0		40
3	<i>Taenia</i>	Huevo	40	1 0	1 0	1 5	5		40
4	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	40	1 5	1 0	1 9	4		38
5	<i>Entamoeba coli</i>	quiste	40	1 0	1 0	1 0	7		37

Concentración de 50 parásitos/30 ml									
1	<i>Entamoeba coli</i>	quiste	50	2 0	2 0	1 0			50
2	<i>Entamoeba histolytica</i>	quiste	50	2 0	2 5	3 3			48
3	<i>Áscaris lumbricoides</i>	Huevo	50	2 5	2 0	4 4			49
4	<i>Áscaris lumbricoides</i>	Huevo	50	2 5	2 5				50
5	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	50	2 5	2 0				45

Tabla de concentraciones 10,20,30,40,50 en método de filtración y Ritchie.

Método de Ritchie.

No filtro	Nombre del parásito	forma	Total inoculo	No de lamina				Total recuperación
2 M								
Concentración de 10 parásitos/30 ml								
1	<i>Áscaris lumbricoides</i>	Huevo	10	3	3	3		9
2	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	10	3	4	2	1	10
3	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	10	4	3	2		9
4	<i>Taenia</i>	Huevo	10	3	4	2		9
5	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	10	3	3	3	1	10
Concentración de 20 parásitos/30 ml								
1	<i>Áscaris lumbricoides</i>	Huevo	20	10	9	1		20
2	<i>Taenia</i>	Huevo	20	10	1 0			20
3	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	20	9	1 0	1		20
4	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	20	9	9	1		19
5	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	20	9	9			18
Concentración de 30 parásitos/30 ml								
1	<i>Trichuris trichiura</i>	Huevo	30	1 0	1 0	1 0		30
2	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	30	9	1 0	1 0	1	30
3	<i>Entamoeba histolytica</i>	Quiste	30	1 0	1 0	5		25
4	<i>Entamoeba coli</i>	Quiste	30	1 0	1 0	1 0		30
5	<i>Áscaris lumbricoides</i>	Huevo	30	1 0	1 0	9		29
Concentración de 40 parásitos/30 ml								

1	Taenia	Huevo	40	1 0	1 0	1 0	1 0		40
2	Áscaris lumbricoides	Huevo	40	1 5	1 0	3	1 0		38
3	Taenia	Huevo	40	1 0	1 0	1 0	5		35
4	Trichuris trichiura	Huevo	40	1 5	1 5	1 0			40
5	Entamoeba coli	quiste	40	1 8	1 5	5			38
Concentración de 50 parasitos/30 ml									
1	Entamoeba coli	quiste	50	2 5	2 5				50
2	Entamoeba histolytica	quiste	50	2 0	2 0	1 0			50
3	Áscaris lumbricoides	Huevo	50	3 0	1 9				49
4	Áscaris lumbricoides	Huevo	50	3 0	1 5				45
5	Entamoeba coli	Quiste	50	2 0	2 0				40

Tabla No 16. Resultado de muestras de análisis por los métodos Ritchie y filtración de muestras crudas de hortalizas naturales y artificiales. Provenientes de los mercados A,B,C. Método cualitativo. n=80

Numero de muestra	Muestras naturales n 40	Muestras Inoculadas n 40	Nombre parásito en muestras naturales
1	Negativo	Presente	
2	A	Presente	<i>Balantidium coli</i>
3	B	Presente	<i>Entamoeba histolytica</i>
4	C	Presente	<i>Entamoeba coli</i>
5	B	Presente	<i>Entamoeba coli</i>
6	C	Presente	<i>Trichuris trichiura</i>
7	C	Presente	<i>Trichuris trichiura</i>
8	A	Presente	<i>Entamoeba histolytica</i>
9	B	Presente	<i>Trichuris trichiura</i>
10	C	Presente	<i>Entamoeba histolytica</i>
11	C	Presente	<i>Ascaris lumbricoides</i>
12	Negativo	Presente	
13	Negativo	Presente	
14	Negativo	Presente	
15	Negativo	Presente	
16	B	Presente	<i>Balantidium coli</i>
17	Negativo	Presente	
18	B	Presente	<i>Entamoeba histolytica</i>
19	Negativo	Presente	
20	A	Presente	<i>Ascaris lumbricoides</i>
21	Negativo	Presente	
22	B	Presente	<i>Entamoeba coli</i>
23	Negativo	Presente	
24	Negativo	Presente	

25	Negativo	Presente	
26	Negativo	Presente	
27	Negativo	Presente	
28	A	Presente	<i>Giardia lamblia</i>
29	Negativo	Presente	
30	Negativo	Presente	
31	Negativo	Presente	
32	Negativo	Presente	
33	Negativo	Presente	
34	Negativo	Presente	
35	Negativo	Presente	
36	A	Presente	<i>Giardia lamblia</i>
37	Negativo	Presente	
38	Negativo	Presente	
39	Negativo	Presente	
40	Negativo	Presente	
Total	16	40	

Anexo II

PARASITOS INTESTINALES MAS FRECUENTES DEL HUMANO VISTOS EN MUESTRAS CRUDAS DE HORTALIZAS POR EL METODO DE FILTRACION y RITCHIE.

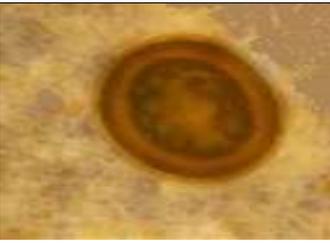
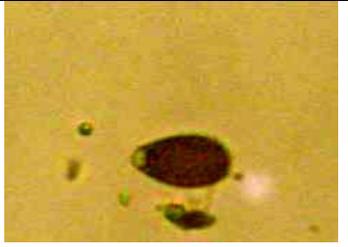
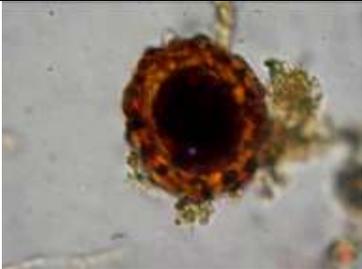
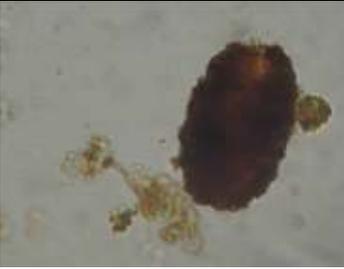
		
<p>Fig. 1.a . Entamoeba coli. 40 x. lugol.</p>	<p>Fig. 1.b Entamoeba histolytica. 40 x. lugol.</p>	<p>Fig. 1.c. Trofozoito de Entamoeba histolytica. 40x. lugol</p>
		
<p>Fig. 1. d..Uncinaria 40 x. lugol.</p>	<p>Fig. 1. e. Ascaris lumbricoides. 10 x. lugol.</p>	<p>Fig. 1.f. Huevo embrionado de Ascaris lumbricoides. 40 x. lugol.</p>
		
<p>Fig. 1.g. Trichuris trichiura. 40 x lugol.</p>	<p>Fig. 1.h. Uncinaria . 40x lugol</p>	<p>Fig. 1.i. Taenia sp. 40x lugol</p>

Fig. 5 Parásitos intestinales por método de filtración.

Continua.....

		
Fig. 1. j. <i>Hymenolepis nana</i> . 40 x. lugol.	Fig. 1.k. <i>Balantidium coli</i> . 40x lugol.	Fig. 1. l. <i>Iodamoeba buchii</i> . 40 x lugol.
		
Fig. 1.m Huevo fértil <i>Ascaris lumbricoides</i> . 40 x lugol.	Fig. 1.n. <i>Uncinaria</i>	Fig. 1.o. Larva <i>Strongyloides stercoralis</i> . 40x lugol.
		
Fig.1.p. <i>Uncinaria</i>	Fig. 1.q. <i>Giardia lamblia</i> . 40x lugol.	Fig. 1. r. Ooquiste <i>Isospora belli</i> . 40 x . lugol.

Continua.....

		
<p>Foto 1. s. Huevo corticado Ascaris. 40 x lugol.</p>	<p>Foto 1 t. Huevo descorticado Ascaris. 40x. Lugol.</p>	<p>Foto 1. u. Ascaris huevo infértil.40 x lugol.</p>
		
<p>Gota lugol. Artefacto</p>	<p>Raíz de planta. Artefacto</p>	<p>Célula vegetal. Artefacto</p>

Anexo III

HELMINTOS	TAMAÑO PROMEDIO EN MICRAS
<i>Uncinaria</i>	Mide de 60 a 70 micras
<i>Trichuris trichiura</i>	Mide 50 x 25 micras
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Mide 45 x 75 micras
CESTODOS	
<i>Hymenolepis nana</i>	Mide 47 x 28 micras
<i>Hymenolepis diminuta</i>	Mide 60 x 80 micras
<i>Taenia</i>	Mide 30 x 40 micras
PROTOZOARIOS	
<i>Giardia lamblia</i>	Mide 8 x 10 micras
<i>Chilomastix mesnilli</i>	Mide 6 x 8 micras
<i>Entamoeba coli</i>	Mide 10 a 25 micras
<i>Endolimax nana</i>	Mide 5 x 10 micras
<i>Entamoeba histolytica</i>	Mide de 10 a 15 micras
CILIADOS	
<i>Balantidium coli</i>	Mide 50 x 100 micras

Cuadro 1. Diámetro de los principales parásitos intestinales del humano.

Anexo V

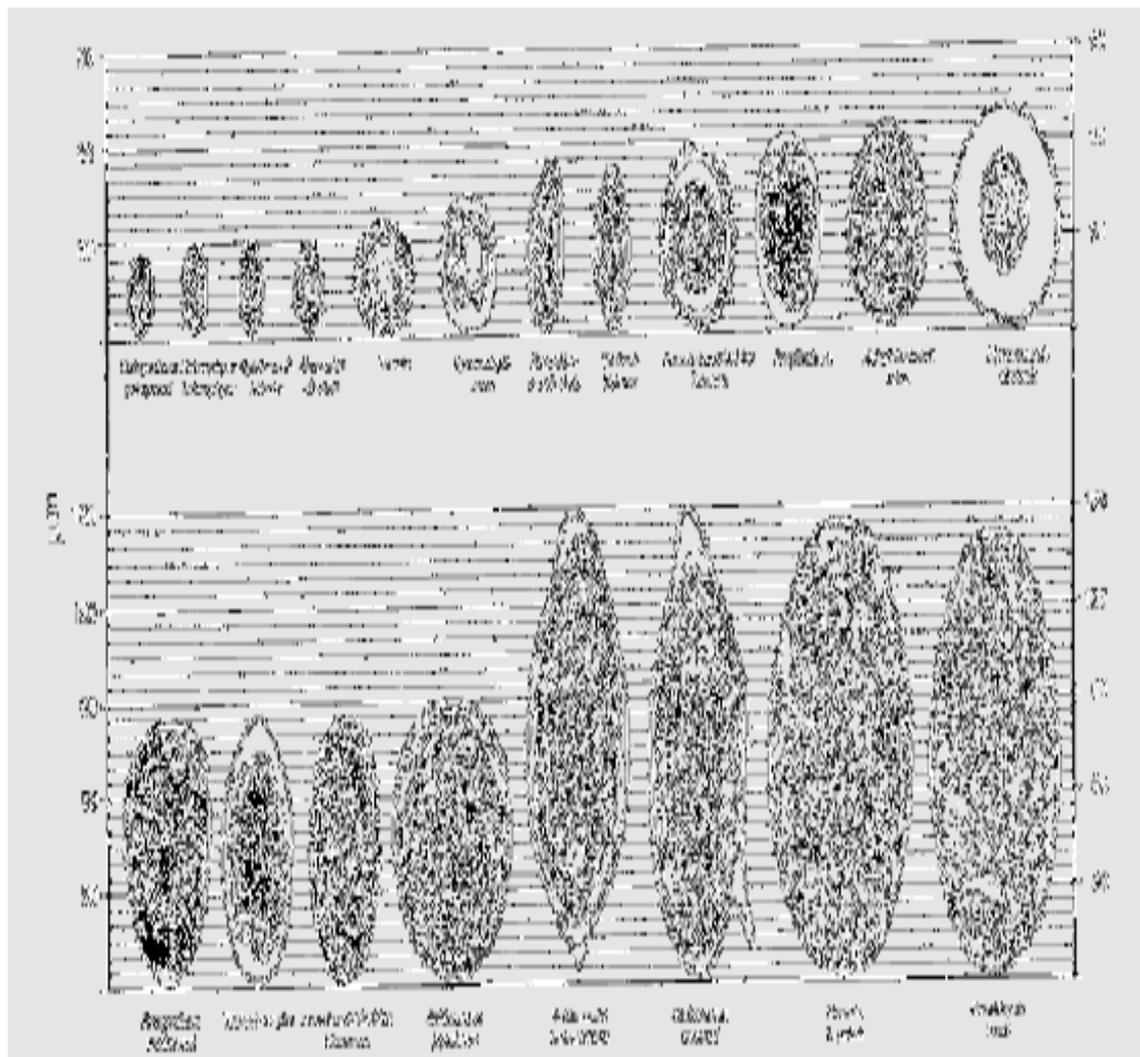


Fig. 7 Tamaño relativo de los huevos de helmintos.

Anexo VI

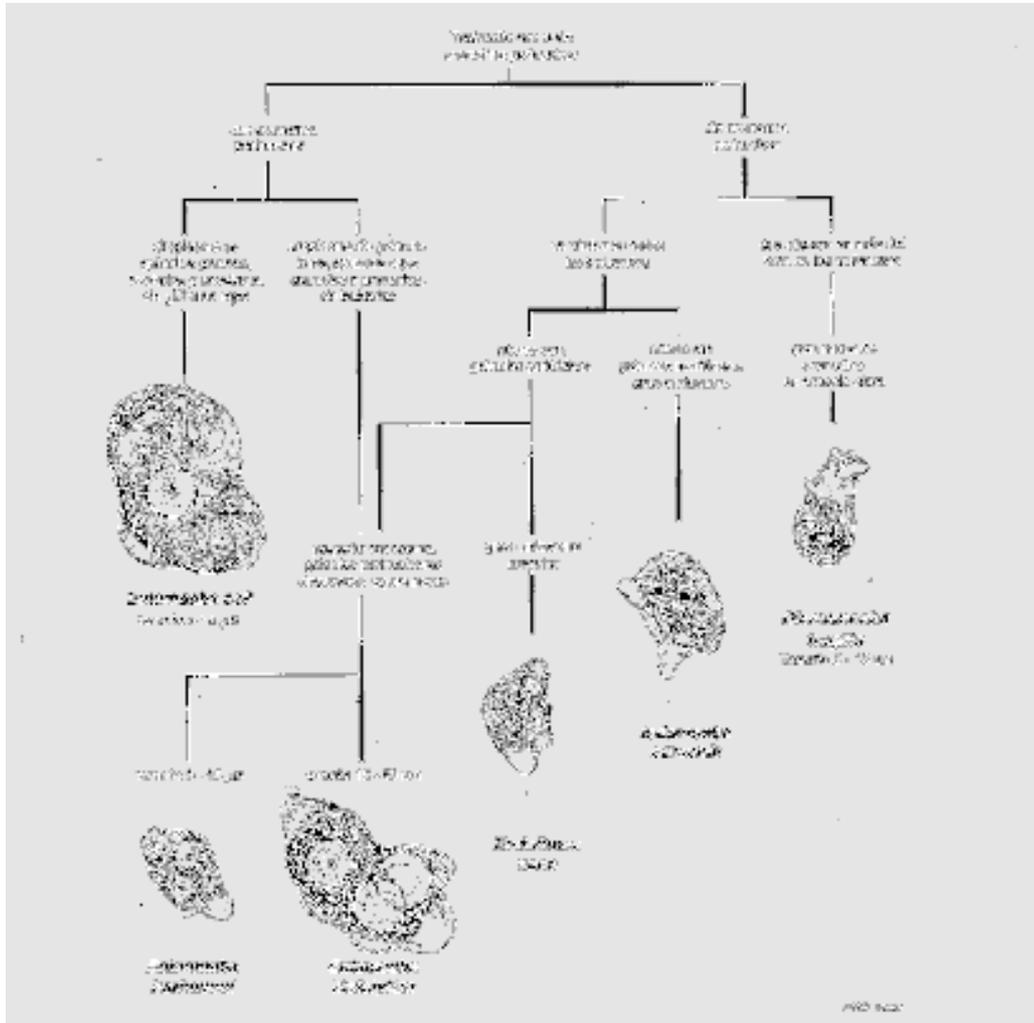


Figura 8. Clave de identificación de trofozoitos amebianos en preparaciones teñidas.

Anexo VII

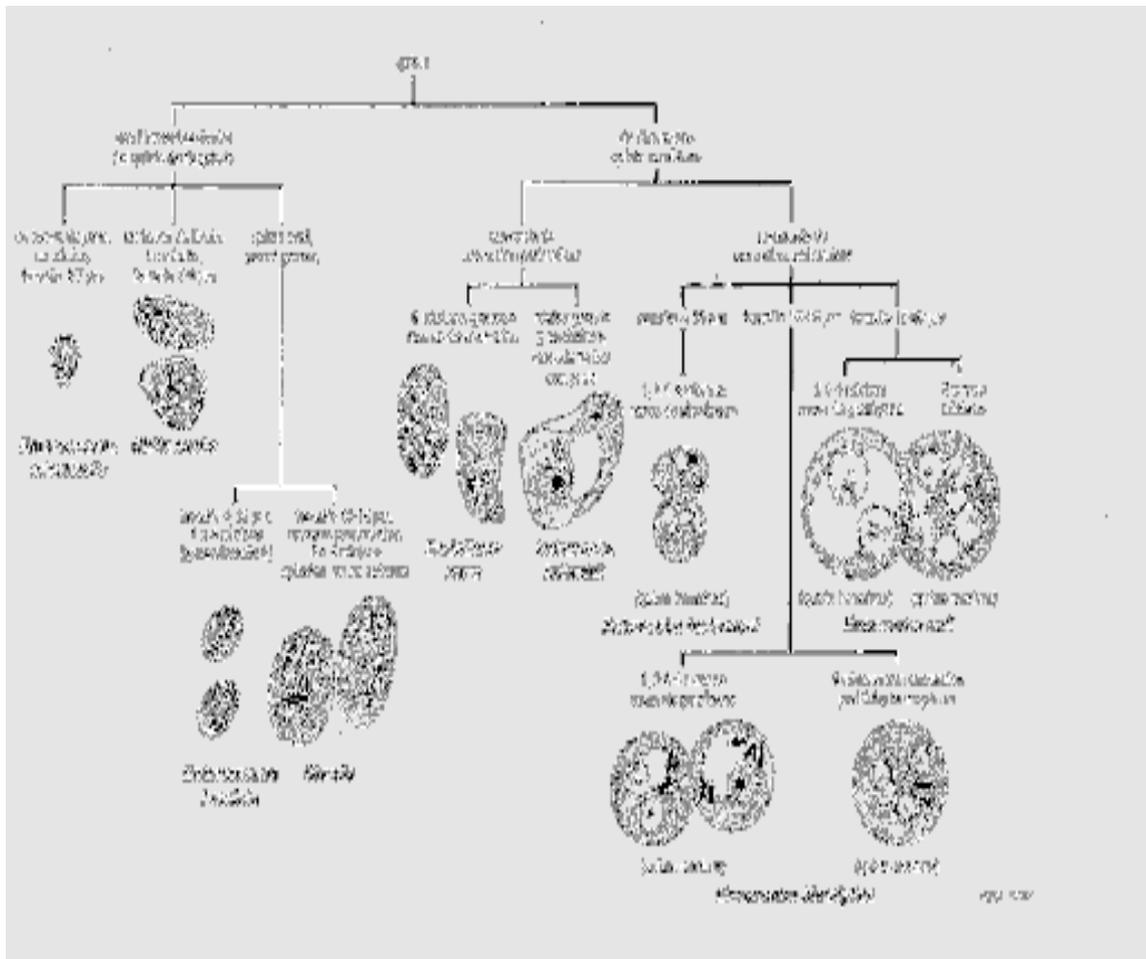


Figura 9. Clave de identificación de quistes de amebas y flagelados.

Anexo VIII

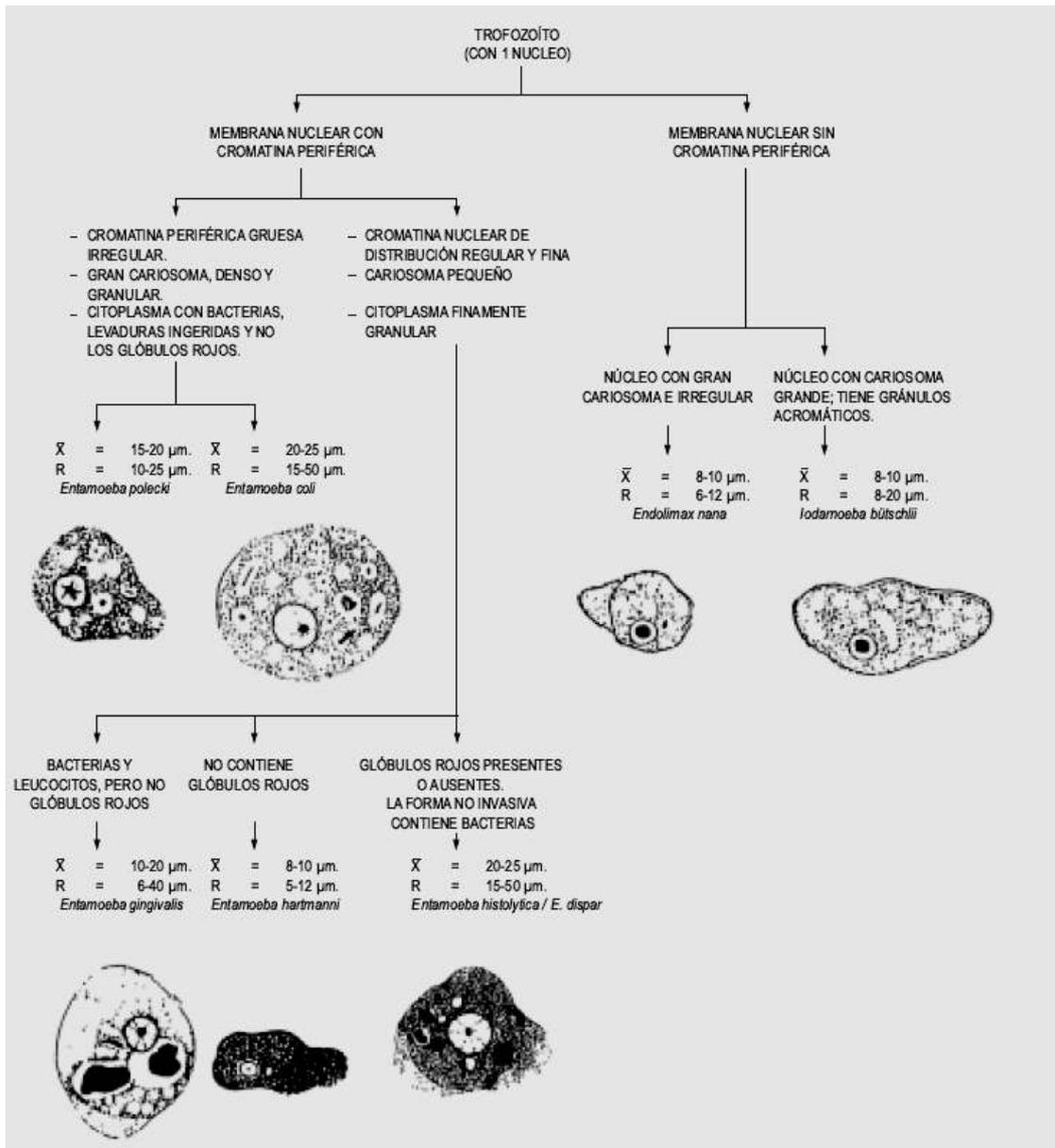


Figura 10. Clave de identificación de los protozoarios, amebas, flagelados y helmintos.

Anexo IX

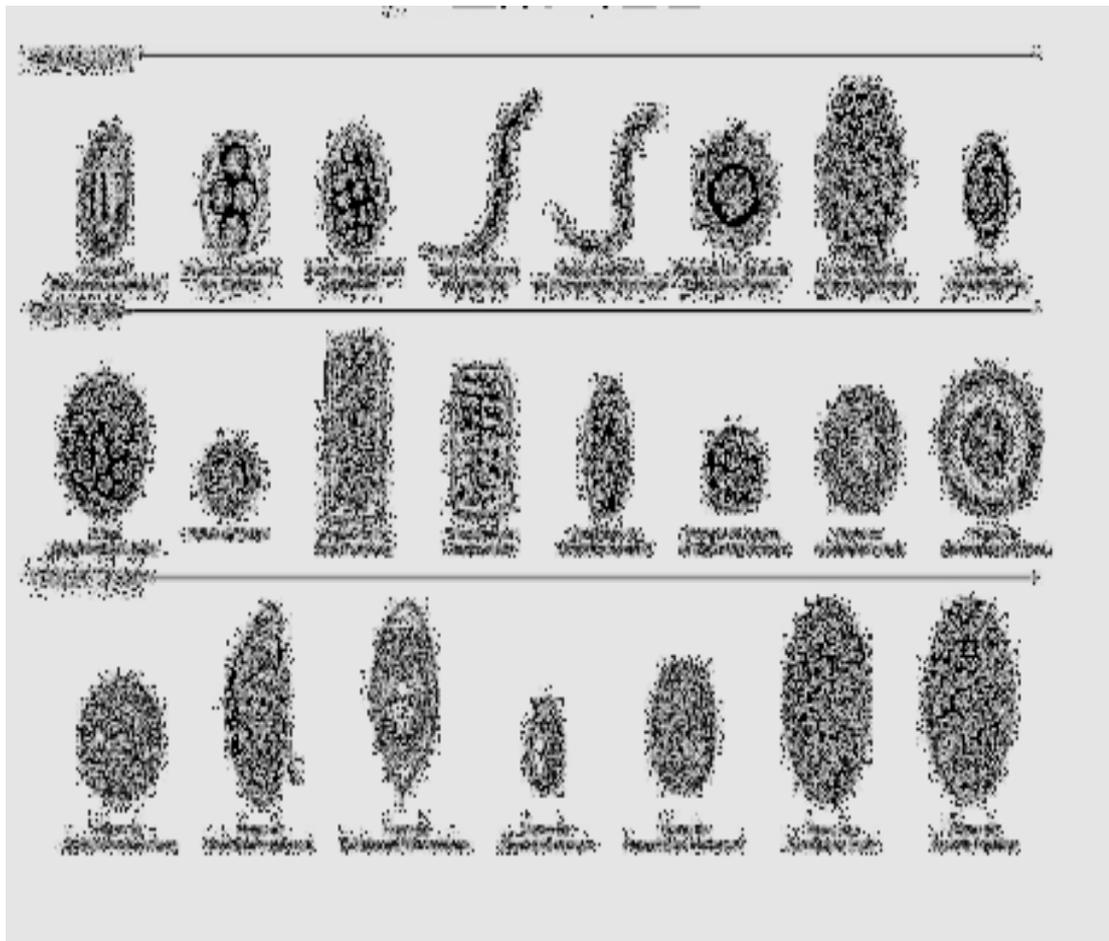


Fig 11. Estadios de helmintos intestinales

Anexo X

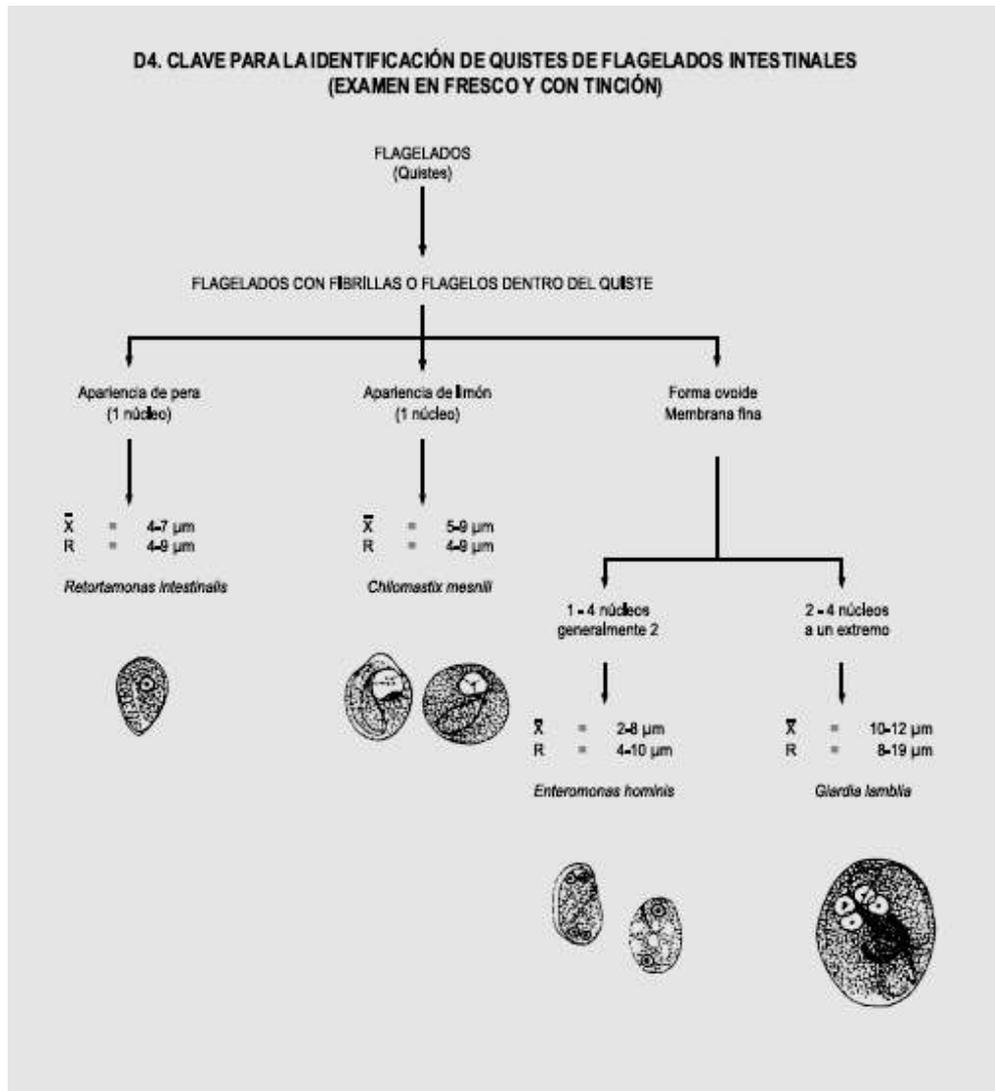


Figura 12. Clave para la identificación de quistes de flagelados intestinales.

ANEXO XI

CONSOLIDADO

Validación método en protozoarios y helmintos por filtración en muestras crudas de hortalizas, provenientes de los mercados municipales A,B,C de

San Salvador. n 40

MUESTRA		Lechuga		Cilantro		Parásitos
MERCADO		Natural	Inoculado	Natural	Inoculado	Muestra
		OABCD	0ABCD	0ABCD	0ABCD	natural
1			++		+++	
2	A		+		++	<i>B. coli</i>
3	B	+	+++		+	<i>E. histolytica</i>
4	C		+	+	+	<i>E. coli</i>
5	B		+	+	++	<i>E. coli</i>
6	C		+++		+	<i>T. trichiura</i>
7	C	+	+		+	<i>T. trichiura</i>
8	A		+	+	+++	<i>E histolytica</i>
9	B	+	+++		+	<i>T. trichiura</i>
10	C		+	+	++	<i>E. histolytica</i>
11	C		+	+	+	<i>A. lumbricoid</i>
12			+		++	
13			+		+	
14			+++		+	
15			+		+	
16	B		+	+	+++	<i>B. coli</i>
17			+		+	
18	B		+++		+	<i>E. histolytica</i>
19			+		+	
20	A	+	+		+	<i>A. lumbricoi</i>
21			+		+++	
22	B		+++		+	<i>E. coli</i>
23			+		+	
24			+		+++	
25			+		+	

26			+		+	
27			+		++	
28	A		+	+	+	<i>G. lamblia</i>
29			+		+	
30			+		++	
31			+		+	
32			++		+	
33			+		++	
34			+		+	
35			+		+	
36	A	+	+		+	<i>G. lamblia</i>
37			++		++	
38			+		+	
39			+		+++	
40			++		+	

Anexo XII

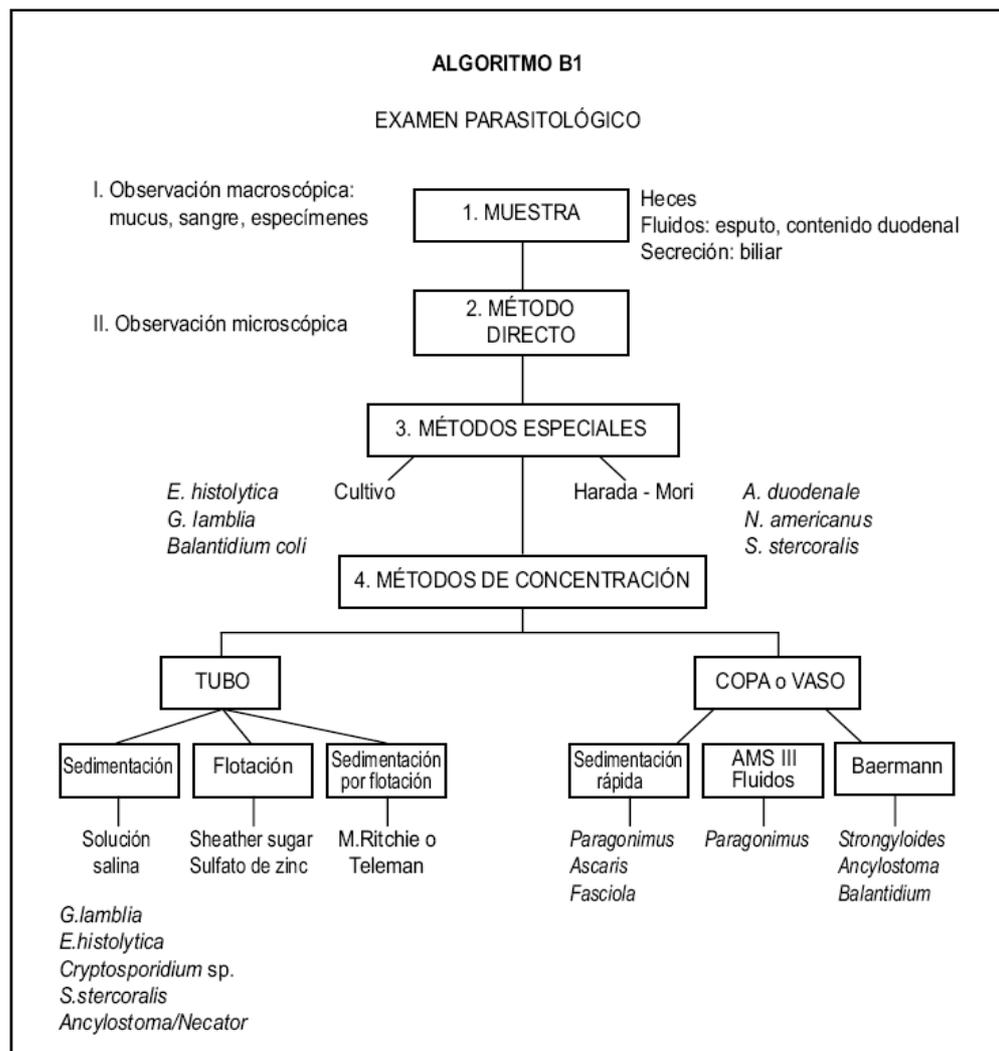


Tabla No 29 Algoritmo para el examen parasitologico.

Anexo XIII

MICROMETRÍA

El tamaño de los parásitos es muy importante como parte de la identificación de sus formas evolutivas, la micrometría es el método que se usa para la medición de los parásitos microscópicos y hace uso de un ocular micrométrico y una lámina patrón.

El ocular micrométrico, es un luna circular marcada con una línea con divisiones de 50 a 100 unidades, con que se mide a los parásitos, estas divisiones tendrán valores diferentes dependiendo de los objetivos a utilizar.

La lámina patrón, es una lámina de vidrio del tamaño de una lámina portaobjetos, que en su parte central tiene grabada una línea con escala conocida en divisiones de 0,1 a 0,01 mm y servirá para dar valor a cada unidad del ocular micrométrico según el objetivo a utilizar, por lo que es necesario calcular los valores de unidades del ocular micrométrico con cada objetivo.

Calibración del microscopio usando un ocular micrométrico:

Procedimiento de calibración:

1. Colocar el ocular micrométrico en el ocular del microscopio
2. Sobre la superficie de la mesa de platino del microscopio colocar la lámina patrón, hacer coincidir ambas numeraciones (ocular micrométrico y la lámina patrón) primero a menor aumento (10x) y luego a mayor aumento, (40x y 100x).
3. Enfocar el microscopio para poder ver las líneas de la lámina patrón
4. Hacer coincidir la línea 0 del ocular micrométrico y de la lámina patrón (figura 30)
5. Cuando estas 2 líneas coinciden, determinar cuantas líneas están coincidiendo entre sí, tratando de encontrarlas lo más alejado hacia la derecha (varía según el objetivo utilizado).
6. Contar el número de divisiones en la línea del ocular que hay entre 0 y las líneas coincidentes, de la lámina patrón y las divisiones de 0,1 mm que hay entre el 0 y las líneas coincidentes a la derecha.
7. Calcular la porción del ocular micrométrico, como en la figura N° 30 y el número de milímetros.

Ejemplo: Unidades del ocular micrométrico 33 igual a 0,22

$$1 \text{ unidad del ocular} = \frac{0,22 \text{ mm lámina patrón}}{33 \text{ ocular micrométrico}} = 0,066 \text{ mm}$$

$$= 0,0066 \text{ mm} \times 1 \mu\text{m}/1,000 \text{ mm} = 6,6 \mu\text{m, del aumento calibrado}$$

Resulta una unidad de ocular micrométrico es equivalente a 6,6 μm

8. Cuando ya ha sido calibrado cada objetivo no se pueden cambiar ni el ocular ni los objetivos, ni intercambiar con otros oculares u objetivos. Se debe calibrar de nuevo.

Puede preparar su tabla de calibración para cada microscopio:

... sigue

Medición (unidades)	Objetivos		
	10X	40X	100X
1	6,6	2,4	1
2	13,2	4,8	2
3	19,8	7,2	3
4	26,4	9,6	4

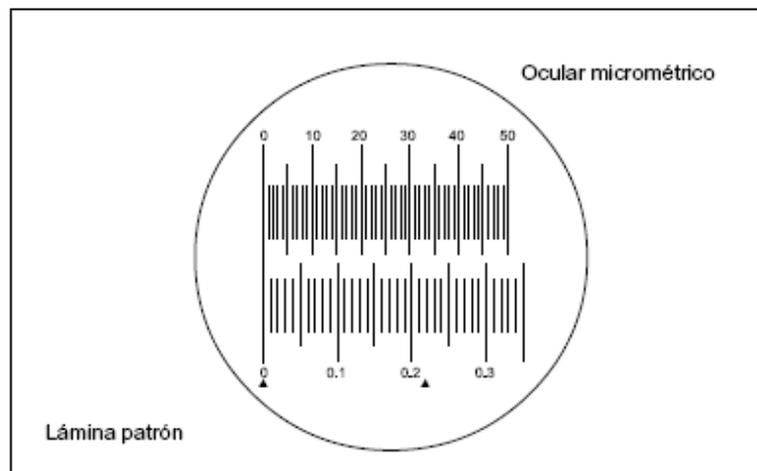
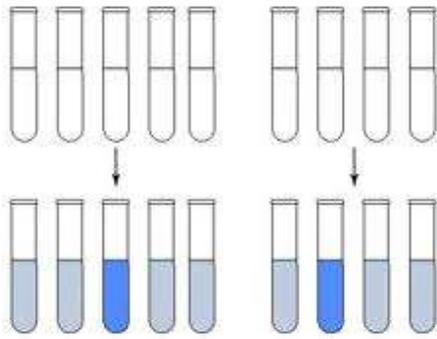


Figura No 13. Calibración del microscopio con el ocular micrométrico.

Anexo XIV

Secuencia del método por filtración.

1. 1ml Pool de Parásitos en 30 ml



O PESAR HORTALIZAS FRESCAS.

- 2.



LAVAR HORTALIZAS EN BOLSAS PLASTICAS O USAR DEL TUBO Y AGREGAR A EMBUDO BUSHNER.

3. USAR FILTRACION AL VACIO.



EQUIPO FILTRACION AL VACIO



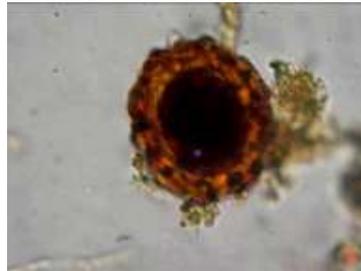
5. LAVAR FILTRO DE 2 MICRAS DEL FILTRADO RAPIDO CON PINCEL Y AGUA DESTILADA O SULUCION SALINA ARRASTRAR AL BORDE DE PLACA DE PETRI.



6. CON PIPETA PASTEUR RECORTADA ASPIRAR Y AGREGAR UNA GOTTA A LAMINAS LUEGO APLICAR LUGOL



7. EXAMINAR A 10x y 40 x
8. HACER RECuento Y OBSERVACION.



Anexo XV

Ejemplo Calculadora Bioestadística para estudios experimentales

Esta aplicación le permitirá calcular la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos positivos y negativos, los Likelihood ratios y las probabilidades pre-test y post-test. Inserte los datos solicitados y haga click en el botón calcular:

Número de casos sin el trastorno en que el examen fue positivo	2
Número de casos sin el trastorno en que el examen fue negativo	4
Número de casos con el trastorno en que el examen fue positivo	38
Número de casos con el trastorno en que el examen fue negativo	36

Limpiar

Sensibilidad:	51.35 %
Especificidad:	66.66 %
Valor predictivo positivo:	95 %
Valor predictivo negativo:	10 %
Likelihood ratio para un resultado positivo:	1.54
Likelihood ratio para un resultado negativo:	0.72
Probabilidad pre-test (prevalencia):	92.5 %
Pre-test-odds:	12.33
Post-test-odds:	19.00
Probabilidad post-test:	95 %

Anexo XVI

p-Value Calculator for the Student t-Test

This calculator will tell you the one-tailed and two-tailed probability values of a t-test, given the t-value and the degrees of freedom.

For more information about this calculator, including properties, formulae, and references, please click [here](#).

Please supply the necessary parameters, and then click the 'Calculate' button.

t-Value: 1.32

Degrees of Freedom: 34

Calculate

Probability 0.195654

(Two-Tailed):

Probability 0.097827

(One-Tailed):

The **Statistics Calculators** index now contains 56 free statistics calculators.

You may also be interested in:

- **Interaction** - a software program by Daniel Soper for drawing and analyzing statistical interactions.
- **N2Mplus** - a free software program by Daniel Soper for converting Excel and SPSS files into Mplus-compatible data files and syntax.

ANEXO XVII

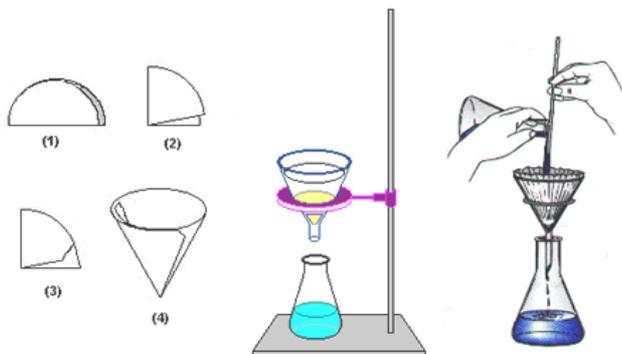
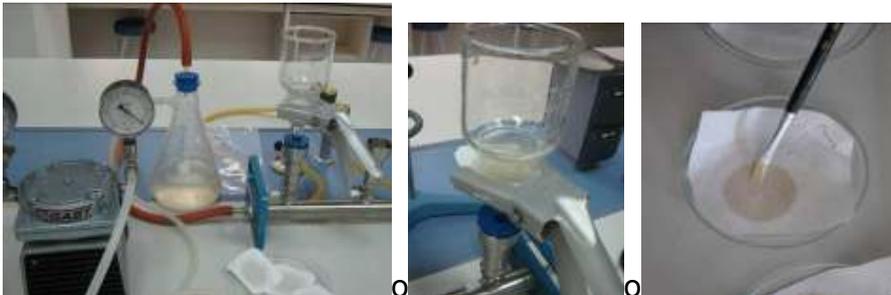
Filtros Ahlstrom menores de 1.5, 2, 6,10 y 25 micras.



Clarkson Laboratory & Supply Inc.
350 Trousdale Drive
Chula Vista Ca. 91910
Phone: 619-425-1932
Fax: 619-425-7917
website: www.clarksonlab.com
e-mail: sales@clarksonlab.com



Filtro menor de 2 micras.

Anexo XVIII**FILTRACION AL VACIO Y POR GRAVEDAD****FILTRACION AL VACIO****FILTRACION POR GRAVEDAD.**

Anexo XX

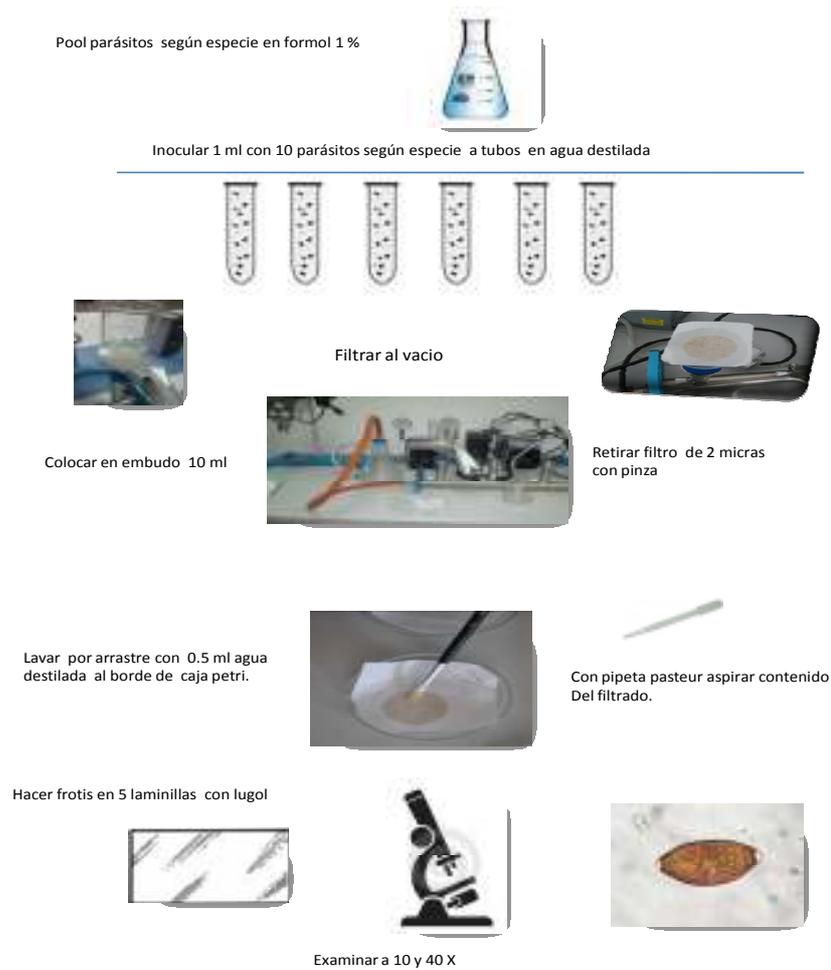


Fig No Método Filtración en muestras inoculadas del pool de parásitos

Figura No 14. Método de filtración usado para análisis cuantitativo en pool de parásitos.

Anexo XXI

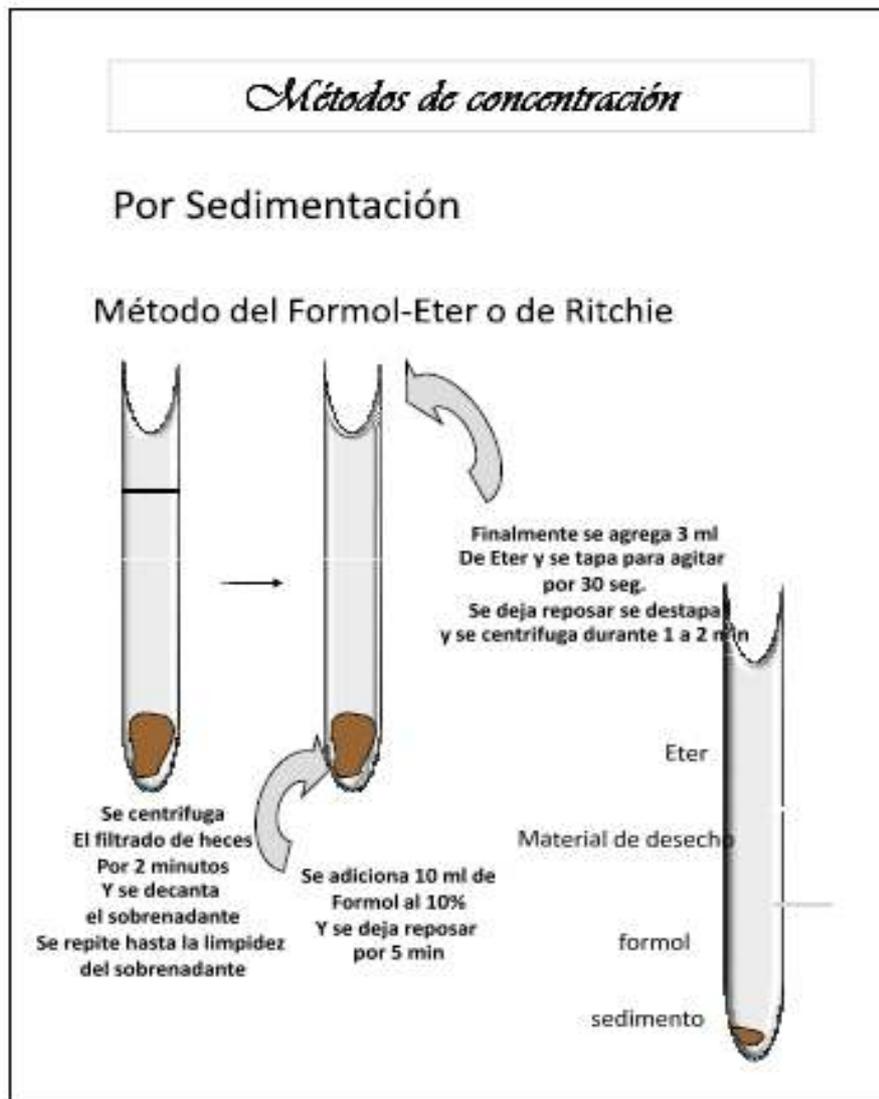


Fig 15 Método de concentración de Ritchie.

Anexo XXII

1. Tabla de Anova

VARIABLE	GL	SC	CM	FC	FT
METODO					
REPETICION					
ERROR					
TOTAL					

Gl: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrados mínimos, FC: F calculado, Ft: F tabla, $F_c > F_t$ para que exista diferencias significativas.

Tabla 2x2 de contingencia

Método		Positivo	Negativo
	Positivo		
	negativo		

Anexo XXIII**DICCIONARIO PARASITOLÓGICO**

Acelomado: Organismos que carecen de celoma. Presenta mesénquima.

Acetábulo: Ventosa muscular ventral de los trematodos. También se dice de las ventosas que presentan algunos cestodos.

Ambiente: lo que rodea

Ameba: forma protozoaria unicelular diminuta

Ameboma: Proceso granulomatoso causado por *E. histolytica*, localizado en intestino grueso. Reacción inflamatoria intensa y proceso de reparación tisular. Granuloma limitado sangrante, obstructivo, en ciego o rectosigmoides.

Ascaris: género de nematodos, gusanos redondos que pertenecen a la familia ascaridoidea.

Axonema: Estructura central de flagelos y cilios; compuesto por el ensamblaje geométrico de nueve pares de microtúbulos periféricos y dos centrales que están recubiertos por una vaina interna. Emerge del cuerpo basal o blefaroplasto.

Axostilo: Estructura de sostén formada por una cubierta de microtúbulos en algunos protozoos flagelados, como *Trichomonas*.

Cepa: conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

Clorofila: pigmento verde de las plantas.

Cisticercosis: Infestación por larvas de cisticerco.

Ciclo biológico ó ciclo de vida: Etapas en el desarrollo de un parásito hasta la fase madura o adulta.

Ciclo de vida directo: Ciclo de vida en que el parásito es transmitido directamente de un hospedero a otro sin necesidad de hospederos intermediarios o vectores.

Ciclo de vida heterogónico: Alternancia de ciclos parásitos y de vida libre.

Ciclo de vida indirecto: Ciclo de vida en la que el parásito requiere de uno o más hospederos intermediarios o vectores y hospedero definitivo

Cilio: Estructura semejante a un flagelo pero de menos tamaño, que se origina igualmente de un cinetosoma. Habitualmente se encuentra en grandes números y dirige los fluidos de manera paralela a la superficie.

Ciliado: Microorganismo cuya movilidad depende de cilios que se encuentran en la superficie celular.

Ciliophora: Grupo taxonómico de protozoarios que incluye a organismos unicelulares, ciliados.

Citoesqueleto: Organización de una red microtrabecular de componentes filamentosos que incluye a los microtúbulos, los microfilamentos de actina y los filamentos intermedios. Estos polímeros, entrelazados mediante interacciones macromoleculares dinámicas se extienden en el amplio dominio del citoplasma hasta interactuar con la membrana celular, el núcleo y organelos celulares.

Citofaringe: Estructura para la ingestión de nutrientes presente en algunos protozoos; usualmente un canal de microtúbulos que ingresa las recién formadas vacuolas alimenticias hacia el interior de la célula.

Citopigio: Conducto que elimina las vacuolas de desecho en organismos ciliados.

Citostoma: Orificio para captura de nutrientes que presentan algunos organismos, entre ellos los ciliados, que se continúa con la citofaringe.

Clonorquiasis: Enfermedad causada por un genero de helmintos.

Comensalismo: Un tipo de simbiosis en la cual uno de los individuos obtiene ganancia de la asociación, sin que el otro, el hospedero, resulte beneficiado o dañado. Los comensales pueden ser internos o externos.

Complejo apical: Conjunto de organelos característicos del phylum Apicomplexa. Se presenta en esporozoítos y merozoítos. Se localiza en uno de los extremos del parásito.

Conducto deferente: estructura que lleva el espermatozoides desde los conductos eferentes hasta la bolsa del cirro en los platelmintos.

Conducto eferente: estructura que lleva el espermatozoides desde los testículos hasta la bolsa del cirro en los platelmintos.

Coprozoico: Organismo que vive en las heces fecales.

Coracidio: Larva ciliada de algunos cestodos.

Especie: categoría de clasificación para organismos vivos o clasificación taxonómica.

Ectoparásito: Parásito que vive en la superficie externa del hospedero.

Embrioforo: Cubierta que rodea a la oncósfera de los platelmintos.

Endoparásito: Parásito que vive en el interior del hospedero.

Endemia: Prevalencia elevada y mantenida de una enfermedad humana determinada dentro de un área geográfica.

Epidemia: Producción, en una comunidad o región, de casos similares en un determinado período, en número claramente superior a la frecuencia habitual y derivados de una fuente común o por diseminación.

Epizootia: Lo mismo que epidemia, pero referido a animales.

Esporogonia: Fase de reproducción sexuada de los esporozoítos.

Esporozoo: Protozoo parásito que se reproduce por esporogonia.

Esporozoito: Elemento resultante de la esporogonia de los esporozoos.

Esquizogonia: Ciclo de reproducción asexual de los esporozoos.

Esquizonte: Elemento resultante del ciclo esquizogónico.

Estróbilo: Conjunto total de proglótidas que constituyen el cuerpo de un cestodo.

Excretas: Productos de desperdicios líquidos y sólidos procedentes de seres humanos y de animales.

Esporozoo: Conjunto polifilético de microorganismos que tienen en común la alternancia de fases de reproducción sexual y asexual. En el Phylum *Apicomplexa*.

Esporozoíto: Organismo delgado, fusiforme, móvil, haploide, resultante de la esporogonia en algunos protozoos del Phylum Apicomplexa. Forma invasiva de algunos organismos del Phylum Apicomplexa.

Esquizogonia: Forma de reproducción asexual de algunos protozoos del Phylum Apicomplexa. Da lugar a esquizontes.

Esquizólisis: Proceso mediante el cual un conidio se separa de otro conidio o célula conidiógenas por lisis del septo que los une.

Esquizonte: Estructura resultante del ciclo esquizogónico. El esquizonte maduro contiene merozoítos.

Equistozomiasis: Enfermedad producida por diferentes tipos de equistozomas.

Estróbilo: En los cestodos. Es el conjunto de proglótidos (segmentos). Durante la estrobilización, los proglótidos, unidad del estróbilo, se encuentran unidos entre sí; cada uno de ellos cuenta con uno o más juegos de órganos de reproducción.

Examen directo al fresco: Consiste en la revisión al microscopio de una suspensión de unos 2 mg de materia fecal en solución salina, con el objeto de visualizar formas parasitarias y su movilidad.

Fómite: Objeto que contiene elementos infectantes y pasivamente puede ser vehículo mecánico en su transmisión indirecta.

Forma infectante: Fase del parásito capaz de infectar el huésped.

Fuente de infección: Persona, animal, vegetal o sustancia desde la cual el agente infeccioso pasa al huésped.

Fecal: perteneciente a las heces.

Filtrado: líquido que se ha pasado a través de un filtro.

Filtrar: pasar líquido a través de cualquier sustancia porosa que evita el paso de partículas mayores de un tamaño determinado.

Formalina: solución acuosa de formaldehído al 37 %

Flagelo: Estructura delgada, con forma de látigo, de presentación única o múltiple y longitud diversa, formada por un axonema central y una vaina externa, continuación de la membrana celular en los organismos eucariotes. Presente en procariotes y eucariotes, con funciones de motilidad y adhesión. Estos apéndices no tienen semejanza estructural con los flagelos en células procariotas.

Giardia: género protozoario que poseen flagelos

Giardiasis: Enfermedad producida por el parásito *Giardia lamblia*.

Heces: excreta de residuos que se eliminan del cuerpo a través del ano

Hábitat: Lugar donde en forma natural vive un ser biológico.

Helminto: Nombre genérico de los vermes parásitos y que abarca acantocéfalos, nematodos, cestodos y trematodos.

Heteroxeno: Parásito que requiere dos o más hospederos para completar su ciclo de vida.

Hipnozoíto: Forma en reposo de *Plasmodium vivax* y *P. ovale* que se encuentra en los hepatocitos. Algunos esporozoítos adoptan esta forma, sin producir datos clínicos hasta que se reactivan, meses o años después, dando lugar a una recaída de malaria.

Hospedero: Persona o animal que alberga a un agente o comensal. También suelen utilizarse los términos hospedador, hospedero y mesonero. Organismo que provee de nutrientes y/o albergue a otro organismo en diversas asociaciones biológicas.

Hospedero definitivo: Hospedero en el cual el parásito alcanza su madurez sexual. Organismo que aloja que las formas adultas o sexualmente maduras del parásito.

Hospedero intermediario: Hospedero en el cual el parásito desarrolla parte de su ciclo evolutivo, sin alcanzar su madurez sexual. Organismo que aloja las formas larvarias, asexuales, o inmaduras del parásito.

Hospedero paraténico: Hospedero facultativo, innecesario para que el agente patógeno complete su ciclo vital.

Infestación: Alojamiento, desarrollo y reproducción de artrópodos en la superficie del cuerpo, pelos, ropas objetos e incluso ambientes. Se emplea también en el caso de roedores. Alojamiento, desarrollo y reproducción de artrópodos en la superficie del cuerpo o en la ropa.

Incidencia: Número de casos nuevos de una enfermedad que se presentan durante un período determinado, en relación con la población donde ocurren. Generalmente se expresa en forma de tasa.

Larva: Forma inmadura en el ciclo evolutivo de helmintos y artrópodos.

Larva filariforme: Tercer estadio larvario (L3), infectante, de varios nematodos. Esta larva carece bulbo esofágico y no se alimenta.

Letalidad: Relación entre el número de casos mortales y el número total de casos de una determinada enfermedad.

Mecanismo de transmisión: Las circunstancias mediante las cuales el parásito pasa de un huésped a otro.

Merozoito: Célula resultante del proceso de esquizogonia o división múltiple que presentan algunos protozoos.

Morbilidad: Relación entre el número de afectados de una enfermedad determinada y la población total de una zona.

Mortalidad: Relación entre el número de muertos por todas las causas y la población total de una zona.

Monoxeno: Parásito que requiere un solo hospedero para completar su ciclo biológico.

Muda: Vaina o tegumento que envuelve a artrópodos y a algunos gusanos (nematodos) y que en las etapas juveniles, de crecimiento, se desprende dando lugar a una nueva envoltura que puede desprenderse a su vez o ser definitiva.

Mutualismo: Tipo de simbiosis en la cual se benefician recíprocamente hospedero y simbiote. Tipo de asociación en la que dos organismos, el hospedador y el mutualista, se benefician de la interacción.

Miasis: Parasitación de órganos o tejidos humanos o animales por larvas de mosca.

Nemaltelminto: Son gusanos de sección redonda.

Morfología: forma de presentación del parásito.

Oncocercosis: Enfermedad producida por la *Oncocerca volvulus* de los ríos.

Oncocercoma: Nódulo subcutáneo que contiene a los adultos de *Onchocerca volvulus*.

Oncosfera: Larva con seis ganchitos que emerge de los huevos de los eucestodos. También se llama hexacanto.

Ooquiste: Forma quística que contiene el cigoto resultante de la esporogonia en los Apicomplexa y los cuales pueden estar cubiertos por una envoltura.

Oportunista infección: Infección producida por organismos generalmente no patógenos en inmunocompetentes, o que causan enfermedad leve y/o

autolimitada, curable con los tratamientos de elección; en sujetos inmunocomprometidos puede dar lugar a enfermedad grave o mortal.

Opérculo: Cubierta o tapa de los huevos de algunos platelmintos e insectos.

Parásito: organismo que vive adentro, encima o a expensas de otro organismo.

Parasitología: parte de la biología que estudia a los parásitos.

Paragonimus: Enfermedad causada por un genero de helmintos.

Partenogénesis: Forma de reproducción en la que se desarrolla un organismo a partir de un huevo no fertilizado.

Patogénesis: Capacidad de los microorganismos para producir una enfermedad.

Patogenicidad: La capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad.

Patógeno: Organismo capaz de producir enfermedad.

Patógeno oportunista: Microorganismo que, en circunstancias habituales, no causa daño, pero que en ciertas condiciones produce enfermedad.

Periodo prepatente: Etapa de la infección parasitaria comprendida desde el momento de la infección hasta la aparición de la sintomatología o la presencia del parásito.

Platelminto: Gusano de sección plana, todos son parásitos.

Portador: Individuo que alberga un agente infeccioso específico, sin presentar manifestaciones de enfermedad y que puede ser fuente de infección para otros individuos.

Proglótido: Segmento de la estróbilo de los cestodos, la cual contiene los órganos reproductores masculinos y femeninos.

Periodo de incubación: Intervalo que transcurre entre la infección de un sujeto susceptible (persona o animal) y el momento que presenta las primeras manifestaciones de la respectiva enfermedad.

Prevalencia: Número de casos de una infección o enfermedad que existe en un grupo específico de población en un momento determinado.

Prevención: Medidas para proteger al hombre o animales contra una enfermedad. Pueden ser independientes de las destinadas al control.

Parásito accidental: parásito que se encuentra en un hospedero.

Parásito facultativo: es aquel que puede cubrir todo su ciclo vital como organismo de vida libre.

Parásito obligado: es aquel que requiere de un hospedero.

Parásito periódico: parásito que cubre una parte de su ciclo vital en el ambiente.

Parásito permanente: parásito que vive toda su existencia en o sobre un hospedero.

Parásito temporal: parásito que intermitente depende un hospedero.

Parasitosis: enfermedad o trastorno que resulta de un parasitismo

Polixeno: Parásito que requiere durante su ciclo vital de un hospedero definitivo y uno o más hospederos intermediarios.

Preparación: elaboración de un medicamento según procedimiento.

Proceso: método de acción.

Proglótido: Segmento del estróbilo de los cestodos, que contiene los órganos reproductores masculinos y femeninos.

Prolapso rectal: Extrusión de la mucosa rectal a través del ano. Puede ocurrir en niños con una alta carga parasitaria de *Trichuris trichiura*; habitualmente sin secuelas después del tratamiento apropiado.

Protocolo: descripción de los pasos que deben de llevarse a cabo en un experimento.

Protozario: concerniente a protozoo

Protozoo: el filum del reino animal que incluye los mas sencillos.

Promastigote: Estadio de desarrollo dentro de la familia Trypanosomatidae; de cuerpo elongado, con cinetoplasto anterior al núcleo y flagelo que emerge libremente del cinetosoma. Sin membrana ondulante.

Quiste: Forma inmóvil de resistencia y de multiplicación, envuelta por una doble membrana formada por los protozoos.

Sedimento: sustancia que se asienta en el fondo

Seudópodo: Prolongación del citoplasma de algunos organismos unicelulares como las amebas, con funciones de locomoción y alimentación

Susceptible: Persona o animal que carece de resistencia contra un agente patógeno y que en consecuencia puede contraer la enfermedad si se expone a la infección por dicho agente.

Spp: abreviatura de especies.

Saprofito: organismo heterotrofo que utiliza materia orgánica.

Taquizoíto: Forma de replicación rápida de *Toxoplasma gondii*, responsable de la diseminación de la infección y de la destrucción tisular. Se le encuentra en sangre y tejidos durante la infección aguda.

Trichuris: gusano nematodo parasitario

Trofozoito: forma vegetativa activa y que se alimenta entre los protozoos o Forma vegetativa activa y que se alimenta, entre los protozoos.

Vacuola contráctil: Parte del complejo de la vacuola contráctil de células protistas, visible en microscopía de luz.

Vector: organismo animal, generalmente artrópodo, que puede transportar activamente un agente desde la fuente infectante hasta un susceptible.

Vector mecánico: Es el vector que lleva en el exterior de su cuerpo o en interior agentes patógenos.

Vía de infección: Sitio a través de los cuales se introduce el agente etiológico en el organismo del huésped.

Xeno: Huésped.

Xenodiagnóstico: examen para detectar ninfas de Tripanosomiasis.

Procedimiento en el que animales de laboratorio ingieren el espécimen a prueba para el diagnóstico de una infección; adquieren la infección si el paciente sufre la enfermedad.