

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**DETECCIÓN DE *Cryptosporidium sp.*, *Cyclospora sp.*, *Giardia sp.*, EN TRES
GÉNEROS DE BIVALVOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA,
RECOLECTADOS DURANTE LA ESTACIÓN LLUVIOSA EN EL GOLFO DE
PANAMÁ**

POR:

YERALDY LORELL FRÍAS MORENO

ASESOR:

NIVIA J. RÍOS CARRERA

Trabajo de Graduación presentado para
optar por el Título de Licenciado en Biología
con orientación en Microbiología y
Parasitología

PANAMÁ, 2022

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

TÍTULO: Detección de *Cryptosporidium sp.*, *Cyclospora sp.*, *Giardia sp.*, en tres géneros de bivalvos de importancia económica, recolectados durante la estación lluviosa en el Golfo de Panamá.

AUTORA: Yeraldy L. Frías M. 8-886-1857

ASESORES:

Nivia Ríos

Asesor Principal

Firma del Profesor.

Fermín Mejía

Asesor

Firma del Profesor.

Janzel Villalaz

Asesor

Firma del Profesor.

DURACIÓN: 12 meses.

LOCALIDAD: Laboratorios de Microbiología de Aguas (LAMA) y Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado-VIP, Universidad de Panamá.

FECHA: 11 de marzo del 2022.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con mucho cariño a quien nunca dejó de creer en mí, quien estuvo ahí en cada momento dándome apoyo y la fuerza necesaria.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a todas aquellas personas e instituciones que han contribuido en la realización de esta tesis. De manera especial quisiera agradecer:

A mis asesores de tesis, los profesores Nivia Ríos, Fermín Mejía, Janzel Villalaz y Alex O. Martínez Torres, por haberme permitido ser parte de este grupo de investigación, dándome la posibilidad de realizar mi tesis de grado.

En especial quiero agradecer a la profesora Nivia Ríos por su constante apoyo y horas dedicada a la elaboración de esta tesis, así como por su gran paciencia y valiosos consejos.

A la Dra. Gesabel Navarro por su colaboración en el desarrollo de esta tesis, ofreciéndome la oportunidad de utilizar las instalaciones del Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET) de la Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, para la utilización de la cámara fotográfica durante la observación microscópica de las tinciones.

A la Dra. Estela Guerrero, directora del Centro de Investigaciones Psicofarmacológicas (CIPFAR) de la Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, por darme su apoyo con el uso de sus instalaciones para la utilización de la centrifuga refrigerada.

A todos mis compañeros, técnicos e investigadores del Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y Laboratorio de Microbiología de Aguas (LAMA).

A mi familia y amigos por estar siempre para mí, por su enorme paciencia, por siempre apoyarme, darme ánimos y estar para mí en cada momento.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto: **“Caracterización genética de virus, bacteriófagos, bacterias y parásitos en tres almejas contaminadas naturalmente en Panamá”**, mediante el convenio N° 041-53-2019 del Fondo de Agua, Área Protegida y Vida Silvestre del Ministerio de Ambiente, en el cual el Dr. Alex O. Martínez Torres es el Investigador Principal.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN.....	7
MARCO TEÓRICO.....	11
1.1. MOLUSCOS BIVALVOS.....	11
1.1.1. Aspectos biológicos.....	12
1.1.1.1. Generalidades anatómicas y fisiológicas	12
1.1.1.2. Alimentación y digestión.....	16
1.1.1.3. Hábitat y ecología.....	18
1.1.2. Taxonomía.....	19
1.1.3. Importancia socio-económica	20
1.1.4. Bivalvos de importancia comercial en Panamá	21
1.1.4.1. <i>Leukoma</i> spp.	21
1.1.4.2. <i>Anadara</i> spp.....	22
1.1.4.3. <i>Donax</i> spp.....	23
1.2. CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS COSTERAS.....	23
1.3. MOLUSCOS BIVALVOS COMO BIOACUMULADORES DE PATÓGENOS HUMANOS	25
1.4. PROTOZOOS INTESTINALES.....	26
1.4.1. Características generales	26
1.4.2. Filo Apicomplexa	27
1.4.2.1. <i>Cryptosporidium parvum</i>	30
1.4.2.2. <i>Cyclospora cayetanensis</i>	43
1.4.3. Filo Sarcomastigophora: Flagelados	47
1.4.3.1. <i>Giardia intestinalis</i>	48
OBJETIVOS	54
Objetivo General.....	54
Objetivos Específicos	54
HIPÓTESIS	54
CAPITULO II.....	55

1.1.	RECOLECCIÓN.....	56
1.1.2.	Características generales del área de estudio.....	56
1.2.	MATERIALES	57
1.3.	PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.....	58
1.4.	LIMPIEZA DE LA MUESTRA.....	59
1.4.1.	Técnica de concentración por flotación	59
1.4.2.	Técnica de concentración por filtración	59
1.5.	PRESERVACIÓN	60
1.5.1.	Preservación con formalina al 10%	60
1.5.1.1.	Tinción de Ziehl-Neelsen.....	60
1.5.1.2.	Tinción de Giemsa	61
1.5.1.3.	Tinción de Koster	61
1.5.2.	Preservación de la muestra con glicerol al 20x	61
1.6.	ESTADISTICA	62
CAPITULO III.....		63
RESULTADOS.....		64
DISCUSIÓN		69
CAPITULO IV		72
CONCLUSIONES.....		73
RECOMENDACIONES		74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		75
ANEXOS.....		85

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁG.
1. Corte del manto y concha de un molusco bivalvo.	11
2. Características generales de la concha de los bivalvos.	12
3. Ciclo general de un coccidio.	27
4. Esquema de un ooquiste esporulado.	37
5. Invasión de <i>Cryptosporidium parvum</i> al epitelio intestinal.	37
6. Efecto de diversos factores ambientales sobre la viabilidad/ infectividad de ooquistes de <i>C. parvum</i> .	40
7. Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> .	41
8. Posición taxonómica <i>Cyclospora cayetanensis</i> según la propuesta taxonómica International Society of Protistology.	44
9. Ciclo de vida de <i>Cyclospora cayetanensis</i> .	45
10. Ciclo de vida de <i>Giardia intestinalis</i> .	52
11. Localización geográfica de los puntos tres puntos de obtención de las muestras: Bahía de Chame, Playa Bique, Playa Santa Cruz de Chinina.	56
12. Presencia de <i>Giardia</i> sp. en los moluscos bivalvos analizados durante los meses de estudio.	65
13. Frecuencia de <i>Cryptosporidium</i> sp. mediante la Tinción de Zielh Neelsen en los moluscos bivalvos analizados durante los meses de estudio.	65
14. Frecuencia de <i>Cyclospora</i> sp. mediante la Tinción de Zielh Neelsen en los moluscos bivalvos analizados durante los meses de estudio.	66
15. Frecuencia de <i>Cryptosporidium</i> sp. mediante las técnicas de montaje directo y flotación en los moluscos bivalvos analizados durante los meses de estudio.	66
16. Frecuencia de <i>Cyclospora</i> sp. mediante las técnicas de montaje directo y flotación en los moluscos bivalvos analizados durante los meses de estudio.	67

	PÁG
17. Frecuencia de <i>Giardia</i> sp. mediante las técnicas de montaje directo y flotación en los moluscos bivalvos analizados durante los meses de estudio.	67
18. <i>Cryptosporidium</i> sp - mediante montaje directo.	90
19. <i>Giardia intestinalis</i> – mediante montaje directo.	90
20. <i>Cyclospora</i> sp. – mediante montaje directo.	91
21. <i>Giardia intestinalis</i> – Tinción de Giemsa.	91
22. <i>Cyclospora</i> sp. – Tinción de Zielh Neelsen.	92
23. <i>Cryptosporidium</i> sp.- Tinción de Zielh Neelsen.	92
24. <i>Cryptosporidium</i> sp - Tinción de Koster.	93
25. <i>Leukoma</i> sp. – recolectada en el mes de noviembre.	94
26. Medición de los ejemplares de <i>Leukoma</i> sp. (A y B) – recolectada en el mes de noviembre.	94
27. <i>Anadara</i> sp. – recolectada en el mes de octubre.	95
28. Medición de los ejemplares de <i>Anadara</i> sp. – recolectada en el mes de octubre.	95
29. <i>Donax</i> sp – recolectada en el mes de septiembre.	96
30. Medición de los ejemplares de <i>Donax</i> sp. – recolectada en el mes de septiembre.	96
31. Procesamiento de la muestra, homogenización del cuerpo con el líquido intervalvar más Buffer Fosfato.	97
32. Porción por cada 100 g de muestra homogenizada, que dio 5 submuestras a la cual se le agregó Buffer Fosfato-Peptona y luego, se pasó por el vortex.	97
33. Limpieza de la muestra con Acetato de Etilo.	98
34. Realización de las tinciones.	98
35. Observación de las muestras al microscopio.	99

ÍNDICE DE TABLAS	PÁG.
Tabla 1. Mecanismos patogénicos de los coccidios en la relación huésped- parásito.	85
Tabla 2. Especies de <i>Cryptosporidium sp</i>	86
Tabla 3. Resultados obtenidos durante septiembre, octubre y noviembre en 3 diferentes zonas de muestreo pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste (<i>Anadara sp.</i>), Bique, Arraijan, Panamá Oeste (<i>Leukoma sp.</i>) , Playa Chinina, Chepo (<i>Donax sp.</i>).	87
Tabla 4. Peso y talla de los ejemplares de bivalvos, considerando su peso completo y peso de la concha sola. demás, el tamaño del bivalvo de mayor tamaño y el de menor tamaño.	88
Tabla 5. Metodología de obtención y procesamiento de muestras.	89

RESUMEN

En Panamá y en muchas partes del mundo, el consumo de moluscos es parte de la dieta diaria de muchas familias, los cuales representan una importante fuente de ingresos económicos. Las aguas de la costa normalmente presentan problemas de contaminación, ya que la mayoría de ellas están rodeadas de pequeños poblados donde no hay control de aguas residuales o en el caso de otros, se dedican a la agricultura y ganadería, haciendo de las zonas costeras lugares propensos a las escorrentías y contaminación. Debido a que los bivalvos se alimentan por filtración de materia suspendida de forma selectiva por tamaño, son capaces de concentrar en gran medida ciertos agentes patógenos como bacterias, virus y en cierta medida parásitos, presentes en la columna de agua. El objetivo de esta investigación fue la detección de protozoarios como *Giardia intestinales*, *Cyclospora* sp. y *Cryptosporidium* sp., en tres géneros de Bivalvos (*Donax* sp., *Leukoma* sp. y *Anadara* sp.) que son de importancia comercial en Panamá, las cuales fueron obtenidas en tres puntos de ventas cercas de las zonas de producción del Golfo de Panamá (Playa Bique Playa de Chinina- Chepo y Bahía de Chame, respectivamente), durante la temporada lluviosa de 2020 (septiembre a noviembre). El estudio parasitológico se basó en las observaciones de la muestra pasadas por un proceso de limpieza, utilizando la técnica de Sheater Sugar, con la finalidad de separar los ooquistes y quistes de protozoos presentes en la muestra. Para confirmar la presencia de *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora* spp., se utilizó la tinción de ácido alcohol resistente o tinción de Zielh Neelsen. Adicionalmente, fue utilizada la tinción de Koster por su afinidad con los ooquistes de *Cryptosporidium* sp., la cual tiene ventaja sobre la tinción de Zielh Neelsen ya que se pueden observar los esporozoitos en el interior del ooquiste. En general, se encontró una alta prevalencia de *Cryptosporidium* sp. durante el mes de octubre, una prevalencia media de *Cyclospora* sp. y una baja prevalencia de *Giardia* sp.

Palabras Clave: Moluscos-bivalvos, *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora* sp., zonas de producción, Panamá.

ABSTRACT

In Panama and in many parts of the world, the consumption of shellfish is part of the daily diet of many families, which represent an important source of economic income. The waters of the coast normally present contamination problems, since most of them are surrounded by small towns where there is no control of residual waters or in the case of others, they are dedicated to agriculture and livestock, making the coastal areas places prone to runoff and contamination. Because bivalves feed by filtration of suspended matter selectively by size, they are capable of highly concentrating certain pathogenic agents such as bacteria, viruses, and of some parasites present in the water column. The objective of this research was the detection of the protozoa as *Giardia intestinalis*, *Cyclospora* sp. and *Cryptosporidium* sp., in three genera of mollusks-bivalves (*Donax* sp., *Leukoma* sp. and *Anadara* sp.) that are of commercial importance in Panama, which were obtained near of the three production zone of the Gulf of Panama (Playa Bique, Playa de Chinina-Chepo and Chame Bay, respectively), during the rainy season of 2020 (September to November). The parasitological study was based on the observations of the sample passed through a cleaning process, using the Sheater Sugar technique, in order to separate the protozoan oocysts and cysts present in the sample. To confirm the presence of *Cryptosporidium* spp. and *Cyclospora* spp., acid-fast staining or Zielh Neelsen staining was used. Additionally, the Koster stain was used due to its affinity with *Cryptosporidium* sp. oocysts, which has an advantage over the Zielh Neelsen stain since the sporozoites can be observed inside the oocyst. In general, a high prevalence of *Cryptosporidium* sp. was found during october in the, medium prevalence in *Cyclospora* sp. and low prevalence in *Giardia* sp.

Keywords: Mollusc-bivalve, *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora* sp., production zones, Panama.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

En Panamá y en muchas partes del mundo, el consumo de moluscos es parte de la dieta diaria de muchas familias, los cuales representan una importante fuente de ingresos económicos. Las aguas de la costa normalmente presentan problemas de contaminación, ya que la mayoría de ellas están rodeadas de pequeños poblados donde no hay control de aguas residuales o en el caso de otros, se dedican a la agricultura y ganadería haciendo de las zonas costeras lugares propensos a las escorrentías. Debido a que los bivalvos se alimentan por filtración de materia suspendida de forma selectiva por tamaño, son capaces de concentrar en gran medida ciertos agentes patógenos como bacterias, virus y en cierta medida parásitos, presentes en la columna de agua (Walker *et al.*, 2018). Algunos géneros de protozoos son de importancia para el ser humano, ya que son agentes patógenos causantes de enfermedades intestinales. Tal es el caso de *Cryptosporidium parvum*, quien, en un estudio realizado en ostras, reveló la presencia de ooquistes de *C. parvum* en agua de mar (Fayer *et al.*, 1998). La prevalencia de *C. parvum* es variable, en función de las características socioeconómicas de la población, ya que es más frecuente en lugares con problemas en las canalizaciones de agua potable o en la eliminación de aguas residuales. Además, se ha encontrado que los brotes de *Cyclospora cayetanensis*, son mayormente transmitidos por alimentos y particularmente se relacionan con alimentos frescos (Herwaldt, 2000).

La mayoría de los parásitos intestinales se transmiten por contaminación fecal del ambiente, por lo que, en este aspecto el agua y los alimentos juegan un papel

importante. El consumo de moluscos bivalvos, ya sea crudos o poco cocidos, se encuentra frecuentemente relacionado a patologías intestinales, ya que los moluscos tienden a alimentarse mediante un proceso de filtración, donde concentran contaminantes bióticos como abióticos. Lo cual se debe principalmente a la contaminación de las aguas por residuos urbanos, ganaderos e industriales (Gómez Couso, 2005).

Los moluscos bivalvos comúnmente son utilizados como especies indicadoras de contaminación, mediante técnicas como el biomonitoreo. Debido a que tienden a acumular contaminantes en sus tejidos, sin mostrar algún efecto perjudicial aparente (Hamza-Chaffai, 2014). Estos organismos son capaces de filtrar grandes volúmenes de agua, reteniendo y concentrando microorganismos. Los mariscos en general, se consideran los mejores indicadores biológicos de las condiciones de salud de los ambientes marinos (Ghozzi *et al.*, 2017). La excreción de ooquistes y quistes infecciosos puede provenir de seres humanos o de una amplia gama de animales domésticos o silvestres. Particularmente, en el caso de las zonas costeras los quistes y ooquistes excretados del ganado y otros animales, así como de las residentes cercanos al área, se vierten a los ríos y de allí se transportan a los estuarios y áreas marinas (Robertson, 2007).

En Panamá, se han realizado estudios para analizar la calidad microbiológica de distintas zonas de producción de bivalvos, como *Anadara sp.*, *Leukoma sp.* y *Donax sp.*, utilizando coliformes termotolerantes (fecales), en donde no se encontró una diferencia significativa en la presencia de coliformes de acuerdo a las distintas zonas estudiadas (Playa Bique, El Espave y Playa el Salado), pero

hubo presencia de los mismos. Demostrando así, la presencia de contaminación fecal en estas zonas de producción (Gómez *et al.*, 2016). Sin embargo, la contaminación por protozoos de transmisión hídrica no siempre se relaciona con los niveles de coliformes termotolerantes. Ya que, aguas supuestamente “limpias” (considerando los recuentos de coliformes termotolerantes) podrían resultar contaminadas por parásitos entéricos humanos (Gómez Couso, 2005).

En Chile, un estudio reciente realizado en la región del Bío Bío, describió la presencia de *C. parvum* en *Aulacomya ater* (cholga), uno de los moluscos de mayor consumo en la población chilena. Siendo este molusco un posible vehículo de transmisión de criptosporidiosis a la población y a sus depredadores. Reflejando también la presencia de contaminación fecal hídrica en las costas evaluadas (Suarez *et al.*, 2020).

Otro estudio realizado en Venezuela en la almeja *Polymesoda solida*, determinó la presencia de un número mayor de bivalvos parasitados durante la época seca (49%), en comparación con la época lluviosa (37%), encontrando valores importantes de *Giardia* sp. y ooquistes de *Cryptosporidium* sp. (Díaz *et al.*, 2017).

Tomando en cuenta la relación de los protozoos intestinales, con las constantes diarreas por el consumo de bivalvos y el aporte que tienen como indicadores de contaminación ambiental, además, considerando la ausencia de estudios en Panamá respecto al tema. Este trabajo tiene como finalidad, determinar la presencia de *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis* y *Cyclospora cayetanensis*, en las costas del Golfo de Panamá en el cual se incluyen sitios de muestreo como Playa Bique, Playa Santa Cruz de Chinina y Bahía de Chame,

siendo puntos importantes de distribución (compra y venta), para el consumo de la población. Procesando distintas muestras de algunos bivalvos como *Anadara* spp., *Leukoma* spp. y *Donax* spp., siendo las tres especies de gran importancia económica en nuestro país, ya que son comercializados en grandes cantidades o para el consumo propio de las familias que viven cerca de las costas. Se busca observar la incidencia de protozoos en los bivalvos antes mencionados durante la temporada lluviosa de 2020 en Panamá. Sometiendo inicialmente las almejas a un proceso de limpieza externo, para eliminar impurezas y así, obtener el cuerpo (sistema digestivo y agallas) y líquido intervalvar que pasará por un proceso de limpieza. Para posteriormente, ser empleados en diferentes técnicas parasitológicas como el montaje directo, técnicas de concentración, filtración y el empleo de tinciones diferenciales (Ziehl Neelsen, Giemsa, Köster) para confirmar la presencia de estos protozoos parásitos.

MARCO TEÓRICO

1.1. MOLUSCOS BIVALVOS

Tienen una larga historia taxonómica, en la que se han utilizado diversos nombres para sus diferentes taxones. Vulgarmente denominados “almejas”, aunque en la literatura científica sean designados como lamelibranquios o pelecípodos, el primer término en alusión a las características de sus órganos respiratorios o branquias, y el segundo, con referencia a la forma del pie u órgano que participa en la locomoción (Camacho *et al.*, 2008). Probablemente, fue Aristóteles el primer científico en reconocer a los moluscos y los dividió en dos grupos: Malachia (cefalópodos) y Ostrachodermata (las formas con concha), dividiendo a los últimos en dos subgrupos: univalvos y bivalvos. Se conocen unas 50000 especies actuales. Los bivalvos forman uno de los grandes filos del reino animal, después de los insectos. Entre los moluscos están incluidos algunos de los invertebrados más conocidos. Las conchas de los moluscos han sido populares desde épocas antiguas y algunas culturas aún la utilizan en distintas herramientas (Jacomé, 2007).

Los moluscos son metazoos, triblásticos, celomados (aunque el celoma se encuentra taponado por la abundancia de tejido conectivo y queda reducido al pericardio, y las cavidades donde se abren nefridios y gónadas), protóstomos (aunque la gastrulación no se produce por embolia), con simetría bilateral. Los órganos internos (vísceras) están concentrados en el dorso formando una masa visceral. Además, son invertebrados no segmentados, de cuerpo blando desnudo o protegido por una concha (García *et al.*, 2011).

1.1.1. Aspectos biológicos

1.1.1.1. Generalidades anatómicas y fisiológicas

Anatomía externa: los bivalvos, poseen dos valvas de igual o diferente tamaño, que pueden o no cerrarse completamente sobre las partes blandas de su interior. De acuerdo a la especie, se conocen distintas formas y colores. Las valvas están formadas principalmente de carbonato de calcio y cuentan con tres capas (Fig. 1). La capa interna o nacarada, capa intermedia o brillante que forma la totalidad de la concha y la capa externa o periostraco, que es una capa pardusca y áspera que tiende a perderse en animales más viejos, debido a la abrasión o el desgaste (Getchell, R.G *et al.*, 2016). Las valvas de los Bivalvos en su gran mayoría son iguales o subiguales, lo que determina un plano de simetría bilateral que contiene al eje de articulación (Fig. 2), que coincide con la dirección antero-posterior del organismo (García-Meseguer *et al.*, 2017).

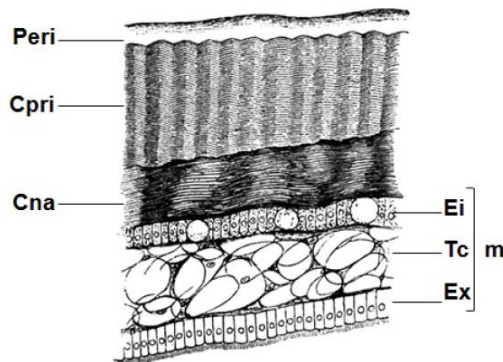


Figura 1. Corte del manto y concha de un molusco bivalvo. Peri: periostraco. Cpri: capa prismática. Cna: capa nacarada. Ex, Ei: epitelio exterior e interior del manto respectivamente. Tc: tejido conjuntivo (dermis) del manto. M: manto. Fuente: Los moluscos bivalvos. Aportes para su enseñanza: teoría-métodos (Darrigran, 2013).

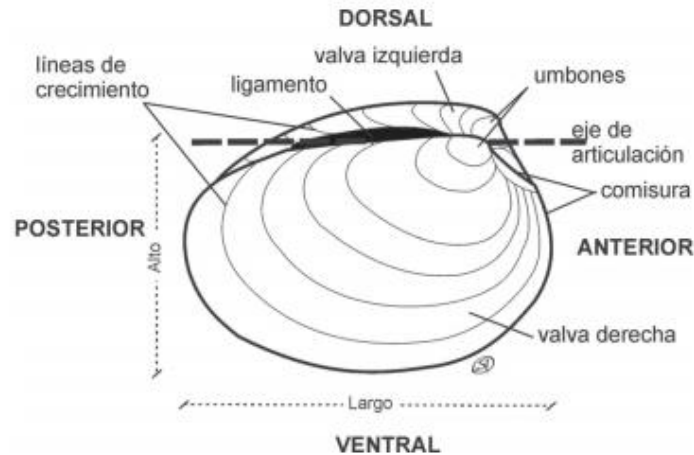


Figura 2. Características generales de la concha de los bivalvos. Esquema en vista dorso-lateral derecha de un heterodonto hipotético con las valvas cerradas, mostrando el aspecto exterior y la orientación general de la conchilla. Fuente: Los Invertebrados fósiles (Camacho et al., 2008).

El umbo o zona de la charnela, vértice de las valvas, lo que es sinónimo de ápice o ápex. Es donde se unen las valvas, es la parte dorsal del animal y la región en el lado opuesto es el margen ventral. Esta es la parte más antigua de la concha y también, la más espesa.

Anatomía interna: en la parte interna de una de las valvas de la concha se pueden apreciar las partes blandas de los bivalvos.

- Manto: Las partes blandas están recubiertas por el manto, que está compuesto de unas finas fundas de tejido de bordes más gruesos. Las dos mitades del manto están unidas a la concha por la charnela en posición ventral de la línea paleal, pero sueltas en los bordes. Los bordes engrosados pueden o no estar pigmentados y tienen tres pliegues: el interno contiene los músculos radiales (músculos paleales), el medio lleva tentáculos y órganos sensoriales, el externo tiene la función de segregar el material orgánico e inorgánico del periostraco, ligamento y capa calcárea

externa de la conchilla. El borde del manto suele tener tentáculos, que en la almeja se encuentran localizados en las puntas del sifón (Getchell, R.G *et al.*, 2016). El manto se compone de dos partes o lóbulos del manto que tapizan interiormente a cada una de las valvas (García-Meseguer *et al.*, 2017)

- **Pie y biso:** El pie es un órgano musculoso, dilatado, que emerge desde la masa visceral a lo largo de la línea media, en dirección anterior, ventral o antero-ventralmente. Su forma es variable. Su función original fue la de servir como un elemento excavador y locomotor en sustratos relativamente blandos, pero los hábitos adoptados por ciertos linajes de bivalvos a lo largo de su evolución han motivado que, a veces, este órgano se pierda durante las primeras etapas, o bien se haya adaptado a reptar sobre un fondo duro. En la almeja se trata de un órgano bien desarrollado que utiliza para excavar en el sustrato y sujetarse. En la parte central del pie hay una abertura desde la glándula bisal a través de la cual el animal segrega una sustancia filamentosa y elástica llamada biso, con la que se puede adherir al sustrato.
- **Branquias:** Se trata de órganos grandes en forma de hoja que se utilizan en parte para la respiración y en parte para filtrar el alimento del agua. Hay dos pares de branquias colocados a ambos lados del cuerpo. La respiración se efectúa por medio de un par de ctenidos, Cada ctenido se compone de un eje longitudinal adosado a la pared visceral, desde la cual parten ventralmente por vasos sanguíneos. Los filamentos poseen una disposición alineada y se hallan en contacto por los cilios constituyendo, en conjunto,

una lámina branquial. Así cada branquia se compone de dos láminas o demibranquias dispuestas simétricamente, una interna y otra externa en el extremo anterior, hay dos pares de lenguas, llamados palpos labiales, que rodean la boca y facilitan la introducción de alimentos (García-Meseguer *et al.*, 2017)

- Sistema muscular: En almejas, se encuentran dos músculos aductores cerca de los márgenes anterior y posterior de las valvas de la concha. Son los de mayor desarrollo y sirven para el cierre de las valvas, ejerciendo así una acción opuesta a la del ligamento, encargado de la apertura de las mismas. De acuerdo a su ubicación se diferencian en anteriores y posteriores. En muchos casos es posible distinguir, aun en las impresiones, las porciones de fibras lisas y estriadas de cada músculo aductor, ya que los haces están separados. El manto se adhiere a la concha por medio de los músculos paleales, los cuales actúan en la retracción del mismo antes del cierre de las valvas, y su mayor desarrollo lo presentan a lo largo de los márgenes paleales formando la línea paleal. Los sifones son retraídos total o parcialmente entre ambas valvas por medio de los músculos retractores sifonales, los que son modificaciones de los músculos paleales (Camacho *et al.*, 2008).
- Sistema nervioso: El sistema nervioso típico de los bivalvos está formado por tres pares de ganglios y un par de largos cordones nerviosos. Desde los ganglios cerebrales salen nervios a los palpos, al músculo aductor anterior y el manto. Los ganglios viscerales envían nervios al tubo digestivo,

al corazón, branquias, manto y musculo aductor posterior. El gangliopedio se encarga de los nervios del pie.

- Hemolinfa: Los moluscos presentan un sistema circulatorio abierto y la hemolinfa desempeña diversas funciones en el molusco entre las que destacan el transporte de pigmentos respiratorio, hemocianina. La defensa del organismo frente a patógenos y el soporte corporal, puesto que el hemocele funciona como un esqueleto hidrostático (Maseda, 2005).

1.1.1.2. Alimentación y digestión

Todos los bivalvos son micrófagos y no poseen mandíbulas, rádulas o aparatos especiales para manipular, cortar o masticar. De acuerdo con el método de alimentación, los bivalvos pueden ser suspensívoros, detritívoros o carnívoros. La mayoría se alimenta de partículas (diatomeas, dinoflagelados, otras algas y bacterias) que se hayan en la suspensión del agua. Otros lo hacen de partículas alimenticias que se encuentran en el sedimento que los rodea y otros consumen presas vivas o muertas que atrapan activamente de distinta manera. Estos tres tipos de alimentación están relacionados con las branquias. Los alimentos llegan a la cavidad del manto transportados por una corriente de agua inhalante (Camacho *et al.*, 2008). Las grandes branquias filtran el alimento del agua y lo dirigen hacia los palpos labiales donde se clasifica antes de pasar a la boca. Los bivalvos tienen la capacidad de seleccionar alimentos filtrados del agua (Getchell *et al.*, 2016). El bolo alimenticio, amalgamado por el moco, pasa de la boca al esófago y penetra en el estómago, en donde se dirige el estilo cristalino que, al rotar y rozar contra el escudo gástrico, facilita la trituración del alimento y su

mezcla con las enzimas digestivas liberados desde el extremo del mismo. El alimento así digerido es absorbido a través de ciertas áreas del estómago que presentan abundantes rugosidades (Gómez Couso, 2005). A veces el alimento es rechazado por los palpos y eliminado por el animal en forma de las denominadas pseudoheces. También, disponen de un esófago corto que une la boca y el estómago se halla totalmente rodeado por el divertículo digestivo (glándula), una oscura masa de tejido que muchas veces se denomina hígado. Dentro del estómago hay una abertura que llega hasta un intestino muy curvo que se extiende hasta el pie en almejas. Otra abertura del estómago conduce hasta un tubo cerrado parecido a un saco, que contiene un estilo cristalino. Tienen un extremo redondeado y otro afilado. El extremo redondeado incide en la placa gástrica del estómago. Se cree que ayuda a mezclar los alimentos en el estómago y libera unas enzimas que facilitan la digestión (Getchell, R.G *et al.*, 2016). En el estómago se presentan dos regiones claramente diferenciadas: la región dorsal en la que desemboque el esófago y los conductos del hepatopáncreas y la región ventral, en forma de saco y de naturaleza glandular, en la que se encuentra un bastoncillo transparente o amarillento denominado estilo cristalino. Esta estructura, de tamaño considerable con respecto al del molusco, es secretada por las paredes glandulares del fondo del saco gástrico y se compone de capas concéntricas de mucoproteínas y enzimas digestivas. Las paredes del tramo superior del saco gástrico están recubiertas de numerosos cilios que, al vibrar, provocan un movimiento de rotación al estilo. De esta forma su extremo anterior gira sobre el escudo gástrico o capa cuticular de la pared, triturando los alimentos y liberando las enzimas digestivas. El estómago presenta numerosos orificios que se

prolongan hacia el exterior, ramificándose notablemente y ofreciendo un aspecto de racimos glandulares cuyos extremos distales son ciegos. Este conjunto se envuelve completamente al estómago, constituye la llamada glándula digestiva hepatopáncreas. El intestino, ciliado y relativamente largo, forma varias asas en su región inicial, atraviesa el pericardio y el ventrículo cardíaco, se prolonga hasta el recto y desemboca en el ano, próximo al orificio exhalante (Gómez Couso, 2005).

1.1.1.3. Hábitat y ecología

Los bivalvos han colonizado prácticamente cualquier hábitat acuático, aunque mayoritariamente viven enterrados en sedimentos en el fondo del mar o de ambientes de agua dulce. La mayoría habita en la zona de los trópicos como aguas templadas. Algunas especies son muy sensibles a su hábitat y sólo se encuentran en ecosistemas muy concretos. La mayoría de los bivalvos viven en hábitats bentónicos donde excavan y se entierran a diferentes profundidades. Se considera como hábitat de un bivalvo al formado por tres aspectos interrelacionados: forma de vida, forma de locomoción o asentamiento y forma de alimentación. Sobre esta base se relacionan las características de la concha y el tipo de hábitat está asociado con las mismas. Muchos tienen una vida sedentaria o incluso sésil, en ocasiones pasando toda su vida en la misma área donde se asentaron en su etapa juvenil. Muchos de estos viven en la zona intermareal, donde solo hay agua cuando la marea es alta pero los sedimentos se mantienen húmedos siempre. En el caso de los bivalvos no sésiles, usan la estructura muscular del pie para moverse entre sus hábitats (Darrigran, 2013; Recio, 2016).

La temperatura y la salinidad son factores que no solo establecen límites en la distribución espacial de bivalvos, sino que también afectan todos los aspectos de la biología, incluida la alimentación, reproducción, crecimiento, respiración, osmorregulación y las interacciones entre parásitos y enfermedades. En las regiones costeras y estuarinas la salinidad es un factor limitante de mucha importancia (Getchell, R.G *et al.*, 2016).

1.1.2. Taxonomía

Jonston, creó el nombre Moluscos (Mollusca) en 1650 para referirse a los cefalópodos y a los cirrípedos (percebes y bellotas de mar), pero el nombre no fue aceptado hasta que fue recuperado y redefinido por Linneo, quien agrupó a todos los invertebrados, exceptuando a los insectos, como Vermes. Dividiéndolo en Intestina, Mollusca, Testacea, Lithophyta y Zoophyta, en donde incluyó a cefalópodos, babosas, pterópodos, tunicados, anémonas, medusas, equinodermos, poliquetos. En el grupo de los quitones, los bivalvos, los univalvos, los nautiloideos, los cirrípedos y a los poliquetos serpúlidos. No fue hasta 1795, cuando Cuvier publicó una clasificación revisada de los moluscos, que fue la primera algo similar a los actuales. Spemgel basó su clasificación en la estructura y disposición del sistema nervioso y dividió a los gasterópodos en Estreptoneuros y Eutineuros. Los estreptoneuros son equivalentes a los prosobranquis y los eutineuros a los opistobranquios y los pulmonados. Los bivalvos se han llamado Bivalvos (Bivalvia), Pelecípodos (Pelecypoda) y Lamelibranquios (Lamelli-branchiat) (Getchell *et al.*, 2016).

El filo Mollusca tiene seis clases, una de las cuales es la de los Lamelibranquis o Bivalvos, dividido normalmente en cuatro subclases: Protobranchia, Heterodonta, Palaeoheterodonta y Pteriomorfa. Donde se encuentran almejas, ostras, mejillones, etc. La clase Bivalvia incluye cerca de 20000 especies actuales, representadas en todas las profundidades y en todos los ambientes marinos (Jacomé, 2007).

1.1.3. Importancia socio-económica

El Pacífico este tropical es uno de los lugares más ricos en diversidad y recursos marinos del mundo. La costa Pacífica de Costa Rica, Panamá y Colombia, se extiende por más de 4000 kilómetros, en el centro del Pacífico americano, en medio de las importantes corrientes marinas que aportan riqueza de nutrientes. Gracias a la posición privilegiada de estos tres países, han desarrollado la pesca de manera artesanal en su costa Pacífica (Posada *et al.*, 2014).

De acuerdo a la Guía Básica para el cultivo de moluscos en bivalvos del Pacífico panameño, en Panamá se promueve el cultivo de moluscos y bivalvos como una alternativa para la producción de alimentos, generar empleos, divisas y para el repoblamiento con fines de recuperación de las poblaciones silvestres o naturales (ARAP, 2012).

La recolección de moluscos es una actividad realizada por hombres, mujeres y jóvenes, a nivel rural en pequeña escala y en especial de bivalvos. Esta actividad supone una alternativa de producción viable para las comunidades pesqueras que viven en condiciones de extrema pobreza, debido a que los moluscos se alimentan en el primer eslabón de la cadena trófica y por tanto no necesitan insumos para

alimentación. Pues poseen un gran potencial para contribuir al alivio de la pobreza, como fuente económica y de proteína animal, además de generar empleos y fuentes de ingresos alternativas a la pesca de extracción. La recolección de moluscos normalmente es realizada de forma artesanal por las comunidades de pescadores de la zona, en la que, en algunos casos la actividad se práctica meramente por subsistencia (Rodríguez, 2009).

Han tenido usos tradicionales en la manufactura y la industria textil: nácar en botines, tejidos de biso, colorantes, etc. Sus conchas trituradas se utilizan para reducir la acidez y mejorar la calidad de los suelos. Su recolección se ha mantenido en el tiempo y ha dado paso a una presencia importante en la gastronomía, así como en ensayos de reproducción en cautividad para satisfacer la demanda alimentaria (García-Meseguer *et al.*, 2017).

1.1.4. Bivalvos de importancia comercial en Panamá

Leukoma spp., *Donax* spp., *Anadara* spp. y otros bivalvos, son especies de gran consumo y explotación en las playas arenosas y manglares, constituyéndose en un recurso de gran importancia económica en algunos países, incluyendo Panamá (I. López *et al.*, 2005).

1.1.4.1. *Leukoma* spp.

Anteriormente llamada *Protothaca* spp., pertenece al Phylum Mollusca, de la Clase Bivalvia, Familia Veneridae. Su concha es grisácea-amarillenta o blancuzca en adultos, con una gran variedad de manchas cafés en los estadios juveniles, que la confunden en el sustrato donde se localiza. Sus valvas poseen costillas finas dándole un aspecto áspero. Concha subcircular o subovada, generalmente de

aspecto tosco, moderadamente convexa. Esculturada, pero muy toscamente con radios. Los radios son esculturados y las costillas radiales tienden a disecarse de forma que se convierten en pares o tríos en el margen ventral (Campos Machado, 2007). Representa un producto marino muy apetecido por la población panameña. Para muchas poblaciones humanas costeras, este bivalvo es una fuente importante de proteína en su dieta, además de ser una fuente de ingreso económico en muchos hogares por ser un producto muy cotizado en los restaurantes (López *et al.*, 2003). Tiene como preferencia playas de sustrato arenoso fangoso con mucha materia orgánica. En nuestro país hay varias playas con las condiciones adecuadas para su desarrollo, sin embargo, en Playa Bique, Arraiján, es donde su extracción es mayor, supliendo los requerimientos para la ciudad de Panamá.

1.1.4.2. *Anadara* spp.

Es un molusco bivalvo de la familia Arcidae, compuesto por dos valvas, conchas grandes y ovaladas. Las valvas presentan entre 33 y 37 costillas. El color es blanco recubierto por una membrana (periostraco) de color café oscuro, hasta negro. Como el suelo del manglar es ácido, el periostraco se destruye a medida que el molusco envejece y se observa el color de la concha (blanca). En habitante de manglares y se les asocia a las raíces del mangle rojo, mangle caballero y el piñuelo. Se distribuye en suelos blandos, fangosos, con salinidades del agua retenida en el manglar no inferior a 10 ups (unidades prácticas de salinidad). Es un molusco que se utiliza comercialmente en toda su área de distribución. En áreas de manglares con pequeñas dimensiones, los habitantes la utilizan para el autoconsumo. Se considera que la concha negra es uno de los principales

recursos extractivos de las comunidades que viven aledañas a los sistemas de manglares, aportando proteínas a su dieta y recursos económicos producto de su comercialización. Se recolecta de forma manual. Se comercializa entero, con su concha, por docena o se extrae la carne y se comercializa por peso. Se utiliza para la preparación de ceviches y diferentes platos de mariscos, ya sea solo o mezclado o con otros moluscos y crustáceos (Cubilla Ríos, 2016). Como fuente de proteínas y recurso económico, para los habitantes de las costas del Pacífico litoral panameño, *Anadara* spp. se convierte en uno de los recursos más importantes siendo uno de los moluscos más explotados (Jordán y Gómez, 2006). En Panamá, existe una fuerte explotación pesquera en los manglares de San Miguel, Montijo, Chiriquí y Chame (Cubilla Ríos, 2016).

1.1.4.3. *Donax* spp.

Es un molusco bivalvo de la Familia Donacidae, habitan en los fondos arenosos en aguas someras tropicales y subtropicales. Son una fuente de alimento para el hombre, se le conoce como concha blanca. Es ovalada romboidal con el extremo anterior redondeado y el extremo posterior truncado; con puntuaciones en las estrías longitudinales, las cuales son más grandes en el extremo anterior y la vertiente posterior. Coloración blanquecina; interior purpureo claro, más oscuro en el extremo posterior (Paredes y Cardoso, 2001).

1.2. CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS COSTERAS

Uno de los problemas sanitarios más críticos en los países de América Latina y otras zonas en desarrollo, es la descarga incontrolada de aguas residuales

domésticas sin tratamiento, las cuales contaminan los recursos hídricos superficiales, subterráneos y las zonas costeras (Campos Machado, 2007).

Las aguas costeras con fines recreativos como las playas por lo general se encuentran en las proximidades de áreas urbanas donde los vertidos sin depurar, con alto contenido de microorganismos patógenos y otros agentes contaminantes, representan uno de los principales problemas sanitarios y ecológicos de las zonas costeras (González *et al.*, 2003). Este tipo de problemas afecta no solo al ecosistema, sino también a las especies que habitan en él, como los bivalvos.

Los bivalvos comúnmente crecen en áreas donde los nutrientes son altos y las aguas están protegidas. Desafortunadamente, tales ambientes están frecuentemente contaminados con materia fecal derivada de humanos ((Walker *et al.*, 2018). Debido a que los bivalvos se alimentan de materia suspendida de forma selectiva por tamaño, son capaces de concentrar en gran medida ciertos agentes patógenos (como bacterias, virus y en cierta medida parásitos) presentes en la columna de agua (Walker *et al.*, 2018), durante este proceso de filtración, estos organismos pueden pasar a través de sus branquias entre 20-100 L de agua, reteniendo microorganismos patógenos como bacterias, virus y protozoos presentes en el ambiente marino. Estos microorganismos se adhieren al mucus secretado por estas estructuras, o bien, pueden pasar hacia el tracto digestivo, acumulándose por largos períodos de tiempo (Suarez *et al.*, 2020). Si los patógenos no se inactivan en el tracto digestivo de los moluscos, o mediante procesos posteriores de preparación mediante cocción, entonces tienen un alto potencial de infectar a quien lo consuma, funcionando como vehículos de infección, debido que tradicionalmente los moluscos se comen crudos o muy

ligeramente cocidos (Robertson, 2007). Algunos autores han reportado la presencia de distintos protozoos patógenos en bivalvos de aguas salada, dentro de los cuales se ha identificado la presencia de *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp., *Cyclospora* sp. (Suarez *et al.*, 2020), por su alto potencial para transmitirse a través de este vehículo (el agua).

1.3. MOLUSCOS BIVALVOS COMO BIOACUMULADORES DE PATÓGENOS HUMANOS

Se sabe que los ecosistemas acuáticos contienen cantidades variables de virus, bacterias, protozoos, microalgas marinas que forman parte de la comunidad. En las aguas marinas, con gran frecuencia podemos encontrar diversos agentes virales. Se estima que generalmente se encuentran en número de 10^{12} partículas virales por litro y comúnmente son los de origen humano lo que se han asociados con casos de enfermedades después del consumo de alimentos contaminados, siendo los virus de ruta fecal-oral son los que mejores se han adaptado para transmitirse a través del consumo de moluscos bivalvos (Gómez Couso, 2005).

En general, los moluscos bivalvos acumulan microorganismos que se encuentran eventualmente en sus aguas, durante el proceso de alimentación, concentrando así de esta forma varios patógenos humanos transmitidos a través de la ruta fecal-oral. El VHA, perteneciente al género Hepatovirus de la familia Picornaviridae, es un virus de ARN de hebra simple en sentido positivo, de transmisión generalmente de persona-persona y vía fecal-oral. Esta última, con capacidad de liberar altas concentraciones del virus (10^7 copias/mL en heces y 2.57×10^3 copias/mL en

aguas servidas) poniendo en riesgo a la población que lleve un inadecuado tratamiento de aguas servidas (Sanhueza y Cachicas, 2020).

1.4. PROTOZOOS INTESTINALES

1.4.1. Características generales

Los protozoarios son eucariotas unicelulares que cuentan con una compleja variedad estructural. Aproximadamente, hay 200000 especies conocidas, de las cuales cerca de 10000 son parásitas (Martinez, 2018). Las infecciones parasitarias por protozoarios constituyen una de las causas mas importantes de mortalidad y morbilidad en humanos en el mundo, ya sea en zonas tropicales, como subtropicales o climas templados (CDC, 2016). Debido a su pequeño tamaño y a la producción de quistes que les permiten resistir condiciones ambientales adversas, muchas especies son cosmopolitas, mientras que otras son de distribución limitada. Algunos forman colonias con pocos o numerosos individuos, con simetría bilateral, radial esférica o sin simetría (Álvarez, 2006)

Algunos son pequeños, flotantes, resistentes a los desinfectantes y pueden sobrevivir en ambientes húmedos durante semanas o meses, incluso cuando se exponen a una amplia gama de temperaturas y salinidades. Lo que puede contribuir a una rápida y generalizada dispersión, especialmente después de la lluvia. La escorrentía debido a la lluvia procedente de paisajes urbanos, suburbanos y rurales, y los desagües de aguas residuales pueden llevar protozoos enquistados a aguas no tratadas. Lo cual genera una gran preocupación por la salud de los animales en las aguas costeras y por los humanos que consumen los mariscos crudos e incluso cocidos (Fayer *et al.*, 2004).

1.4.2. Filo Apicomplexa

El filo Apicomplexa es un gran grupo de protistas parásitos con más de 6000 especies descritas y posiblemente miles de especies no descritas. Todas las especies son parásitos obligados, es posible que en todos los vertebrados y en la mayoría de los invertebrados, alberga al menos una especie de apicomplejo. El ciclo de vida de la mayoría de los Apicomplexa implica multiplicación sexual y asexual en el hospedador parasitado y se forma un quiste ambientalmente resistente (Martinez, 2018). Entre las enfermedades que afectan a los humanos destacan las coccidiosis, causadas por *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, entre otros. Los coccidios intestinales, parásitos protozoarios se caracterizan por presentar un complejo apical en el que se localizan diferentes organelos que les permiten invadir y replicarse en la célula huésped (García D. y Rivera F., 2017).

Los parásitos intracelulares utilizan diversas estrategias para invadir las células, en el caso de los Apicomplexos utilizan un sistema de motilidad basado en la adhesión llamado “deslizamiento” para penetrar activamente a las células huésped. El término “deslizamiento” es algo engañoso, ya que es necesario un cambio continuo del sistema generador de fuerza para impulsar el movimiento hacia adelante. La motilidad dependiente de la polimerización de actina facilita la migración del parásito a través de las barreras celulares, permite la diseminación dentro de los tejidos y potencia la invasión de las células huésped, incluyendo *Cryptosporidium* spp. Los apicomplexos se pueden visualizar fácilmente mediante la tinción de anticuerpos específicos, cuando se examinan en microscopia de

video de lapso de tiempo, el deslizamiento ocurre a velocidades de 1 a 10 $\mu\text{m/s}$, más de diez veces la velocidad de las células ameboides (Sibley, 2004).

Los ciclos vitales de los Coccidios se dice que son complicados y existen muchas variaciones según los grupos y especies, en un ciclo típico (Tabla 1) y complejo se consideran tres fases: esquizogonia (merogonia), gamogonia (gametogonia) y esporogonia (Fig. 3). Siendo todo el ciclo haploide, excepto el cigoto, que es diploide (García *et al.*, 2008).

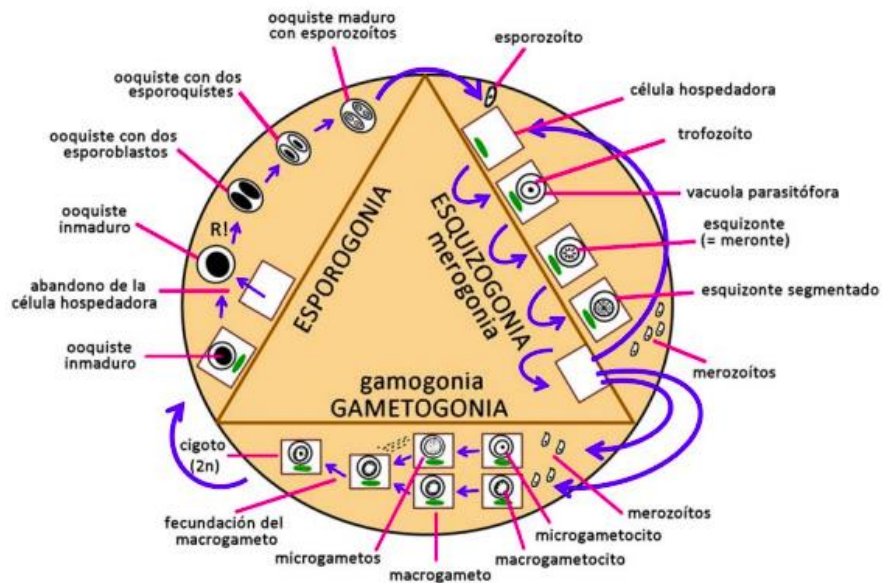


Figura 3. Ciclo general de un coccidio. Fuente: Coccidios intestinales y tisulares (I. García *et al.*, 2008).

El mecanismo por el cual los coccidios inducen diarrea, incluye la combinación del aumento de la permeabilidad intestinal, la secreción de cloro y la mala absorción como consecuencia de la destrucción de las vellosidades intestinales. Que en individuos inmunocompetentes, la infección se limita al intestino delgado, mientras que en pacientes inmuno-comprometidos, principalmente en personas con SIDA, puede haber infecciones extraintestinales. Existen distintos factores de virulencia

en los parásitos protozoarios, que están relacionados con distintas funciones, como la adhesión, colonización, invasión, supervivencia intracelular, nutrición, evasión de la respuesta inmune del huésped (García D. y Rivera F., 2017).

1.4.2.1. *Cryptosporidium parvum*

Historia y clasificación

En 1895, Clarke observó por primera vez ooquistes de *Cryptosporidium* en el epitelio gástrico de un ratón. Los describió como “múltiples esporas situadas sobre el epitelio gástrico” y las identificó como *Eimeria falciforme*. La criptosporidiosis es una enfermedad relativamente nueva, en 1907 Ernest Edward Tizzer aisló un parásito en glándulas gástricas de ratón de laboratorio, al que llamó *Cryptosporidium muris*. En 1912 encontró en intestino el de un ratón otra nueva especie, a la que denominó *Cryptosporidium parvum*, que difiere de la especie tipo tanto en el lugar de la infección como en la morfología de los ooquistes. En la década de los cincuenta se les asoció a enfermedades diarreicas en aves. En 1971, *Cryptosporidium parvum* se volvió de interés al descubrirse que también se producía en ganado vacuno (Garza y Morales, n.d.). Antes de su descripción en humanos, se consideraba un patógeno únicamente de animales domésticos con 1-3 semanas de edad, considerándose raro en adultos. En 1976, se reportó el primer caso de criptosporidiosis en humanos, fue diagnosticado en una biopsia rectal de una niña de tres años y que no presentaba problemas inmunológicos, pero tiempo después casi no se reportaban casos, y desde esa fecha hasta 1982, solo se habían reportado 7 casos, todos mediante diagnóstico por biopsia rectal o intestinal, de los cuales, algunos fallecieron (González y Suárez, 1991; Vasquez *et al.*, 1986). Que se le asociaban a diarreas severas en pacientes inmunocompetentes. Los pacientes con sistemas inmunocomprometidos no respondían al tratamiento antidiarreico conocido en ese momento y morían, lo cual

llamo la atención de los investigadores con el propósito de ampliar la información que se conocía en ese entonces y encontraron que la enfermedad también afectaba a personas con un sistema inmunológico normal, sin importar la edad, pero siendo los más susceptibles los niños y ancianos (Cieloszyk, 2016).

Varios estudios moleculares y filogenéticos sugieren que el género *Cryptosporidium* surgió en los Apicomplexa como un linaje independiente mucho antes en el tiempo que los considerados coccidios típicos. Las caracterizaciones moleculares de *Cryptosporidium* han validado la existencia de múltiples especies en la clase vertebrada: hoy, existen evidencias en diversos hospederos de al menos 21 especies y 61 genotipos de amplia distribución geográfica.

Taxonomía

En algunas ocasiones se sugirió *Cryptosporidium* como un género monoespecífico, sin embargo, posteriores estudios de transmisión cruzada y recientes aportaciones moleculares invalidaron esta hipótesis. En los últimos años la caracterización molecular de aislados de *Cryptosporidium* ha permitido clarificar la confusa taxonomía de las especies de este género, y así validar la existencia en diferentes especies para distintos hospedadores. Se han clasificado distintas especies basándose en diferentes parámetros que van de datos morfológicos hasta aspectos biológicos, especificidad del hospedador, consecuencias histopatológicas y particularidades moleculares (Gómez Couso, 2005).

Además, de las 17 especies incluidas en el género (Tabla 2), hay alrededor de 40 genotipos de *Cryptosporidium* descritos en las últimas décadas (Del Coco *et al.*, 2009). La clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: ***Protozoa***

Organismos unicelulares sin pared celular externa rígida: con orgánulos membranosos: núcleo, vacuolas, mitocondrias, aparato de Golgi, lisosomas.

Filo: ***Apicomplexa***

Extenso grupo de protistas exclusivamente endoparásitos. Que se caracterizan por la presencia de un orgánulo único denominado complejo apical, que es una adaptación que le permita la entrada a la célula hospedera.

Clase: ***Conoidasida***

Su orgánulo característico (complejo apical) incluye vesículas llamadas roptrias y micronemas, que se abren en la parte anterior de la célula, que secretan enzimas que permiten la entrada a la célula huésped. Presentan también un cono de fibrillas denominado conoide.

Subclase: ***Coccidiasina***

Se caracterizan porque los gametos maduros se desarrollan intracelularmente y el cigoto es generalmente inmóvil.

Orden: ***Eucoccidiorida***

Orden más grande de la clase Conoidasida y contiene aquellas especies que experimentan merogonia (asexual), gametogonia (sexual) y esporogonia (formación de esporas) durante sus ciclos de vida.

Suborden: ***Eimeriina***

Todas las especies son homóxicas o facultativamente homogéneas. La formación de merogonia, gamogonia y ooquistes, todo se produce dentro de la misma máquina. Esporozoitos incluidos en esporoquistes dentro de los ooquistes; microgametocito produce numerosos microgametos; cigoto inmóvil.

Familia: ***Cryptosporidiidae***

Formado por Eimerinos cuyo desarrollo se produce justo debajo de la superficie de la membrana celular o en el borde estriado de la célula hospedadora.

Género: ***Cryptosporidium***

Asociado a la enfermedad denominada criptosporidiosis diarreica en seres humanos y presente animales.

Un estudio de los genes de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (ARNr), permitió dividir el género *Cryptosporidium* en dos grupos: uno formado por *C. muris* y *C. serpentis*, y otro formado por *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. wrari* y *C. parvum* (Arvayo, 2016). Por otro lado, diversos estudios moleculares y filogenéticos sugieren que el género *Cryptosporidium* surgió en los Apicomplexas como un linaje independiente mucho antes en el tiempo que los considerados coccidios típicos, con los que no formaría un grupo monofilético sino que más bien parece conformar un taxón hermano de los Coccidia y los Hematozoa. Lo que explicaría algunos rasgos dentro del género, como la localización epicelular de los estados de desarrollo, la ausencia de un genoma extracelular y de un plástido característico de muchos miembros de este phylum y el metabolismo de las poliaminas. Datos moleculares recientes indican que *Cryptosporidium* está más relacionado filogenéticamente con los gregarínidos que con los coccidios, además su proximidad se puede apoyar en las observaciones biológicas que demuestran la existencia de estados extracelulares en el ciclo biológico de *Cryptosporidium* (Gómez Couso, 2005).

De manera característica, este género presenta una gran dificultad en la identificación de sus especies a partir de la morfología del ooquiste, ya que las

diferencias en algunos casos, son indetectables. En la actualidad se recurre a la biología molecular para identificar especies y genotipos (Del Coco *et al.*, 2009).

Biología y morfología

Cryptosporidium se desarrolla, preferiblemente en las microvellosidades de las células epiteliales del tracto gastrointestinal, pero puede ubicarse en otras partes, como parénquima pulmonar, vesícula biliar, conductos pancreáticos, esófago y faringe. Parasita la parte externa del citoplasma de la célula y da la impresión de estar ubicada fuera de ella; varios autores designan esta ubicación como extracitoplasmática intracelular (Neves, 2004).

El *Cryptosporidium* es monoxeno (completa su ciclo en un huésped). Con ruta de transmisión fecal. Pudiendo darse de persona a persona o de animal a persona por la ingestión de agua o alimentos contaminados por heces. La fase infectante y a la vez único estado exógeno de este parásito es el ooquiste, elemento de resistencia y que permite la diseminación de la infección. Contiene dentro 4 esporozoitos periféricos y un cuerpo central (Del Coco *et al.*, 2009).

Los ooquistes son ovoides o esféricos y miden entre 4 μm y 6 μm , son muy resistentes y pueden sobrevivir mucho tiempo fuera del hospedador (Cieloszyk, 2016). El ooquiste presenta una par de de tres capas, que pueden ser finas o gruesas, la cual se relaciona a diferentes vías de desarrollo esporogónico y de infección. La capa externa de 5 nm de espesor, presenta abundante material filamentoso y glicoproteínas ácidas; que puede ser parcialmente eliminada por efecto del hipoclorito de sodio. Está separada por 5 nm de distancia de una capa central rígida y electrodenda, de 10 nm de espesor. Cuenta con una composición

lipídica y glicoproteína, lo que confiere propiedades de ácido-alcohol resistencia. La capa interna de composición glicoproteica presenta 20 nm de espesor. Esta provee a la pared cierta rigidez y a la vez elasticidad. Una característica única que distingue al género *Cryptosporidium* spp. es la presencia de una línea de sutura en la pared del ooquiste, la cual durante el desenquistamiento permite la salida de los esporozoitos (Criollo y Flores, 2015).

El cuerpo residual presenta elementos esenciales para la supervivencia del parásito. En su interior se encuentran una vacuola lipídica característica, inclusiones proteicas, ribosomas, citomembranas y gránulos de amilopectina, que proveen nutrición a los esporozoitos. Los esporozoitos por su parte, miden entre 4.5 μm y 7.9 μm alargados y en forma de coma o semilunar, con 8 cromosomas cada uno presenta uno de los genomas más pequeños de los organismos unicelulares eucarióticos (Cieloszyk, 2016; Rodriguez y Royo, 2001) Con el extremo apical afinado y el posterior redondeado. Los microtúbulos, están situados lateralmente por debajo de la membrana plasmática unidos al anillo polar, recorriendo el cuerpo del esporozoito desde el ápice hacia su parte media. Ellos permiten su desplazamiento y actúan durante el proceso de invasión (Del Coco *et al.*, 2009). En el extremo anterior del esporozoito se presenta el complejo apical, compuesto de organelas secretorias (roptrías, micronemas, gránulos densos) y componentes no vesiculares (conoide y microtúbulos subpeliculares). Las roptrías y los micronemas tienen como finalidad permitir al esporozoito adherirse e invadir la célula hospedadora, induciendola a envolver el parásito en la vacuola parasitófora (Boulter-bitzer *et al.*, 2007).

Cryptosporidium produce 2 tipos de ooquistes, unos de pared gruesa que son liberados al medio ambiente con las heces del huésped y otros de pared delgada que desenquistan una vez y son liberados de la célula huésped (García D. y Rivera F., 2017). Una característica importante de los ooquistes, es que pueden tener el mecanismo de “eclosionar” antes de que se desprendan del hospedador, causando una reinfección y un aumento exponencial de la carga de parásitos, lo que llevaría a una infección crónica, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (Innes *et al.*, 2020). Su presencia puede llegar a ser de manera asintomática en personas sanas e inmunologicamente competentes, o podría causar diarrea acuosa, náuseas, vómitos, fiebre y dolores abdominales intensos. Los mecanismos que dan lugar a la diarrea osmótica, inflamatoria y secretora que se presenta en esta enfermedad, son consideradas provenientes de un origen multifactorial, involucrando tanto al parásito como a sus productos, además de la respuesta inmune del hospedero, que da lugar a deficiencias en la absorción a nivel de intestino delgado e incrementan la excreción de compuestos: adhesión, células T, apoptosis, daño celular (Arvayo, 2016).

Ciclo de vida

Su ciclo tiene dos fases, la merogonia o esquizogonia, que es la fase asexual y la esporogonia que es la fase sexual (Cieloszyk, 2016). Para que el ooquiste sea infectante debe contar con cuatro esporozoitos viables. Con la esquizogonia se inicia el ciclo, que tiene lugar después de la ingestión de ooquistes esporulados (Fig. 5) una vez en el intestino por acción de distintos factores, como: condiciones no favorables, dióxido de carbono, temperatura, enzimas pancreáticas y sales biliares, se da el desenquistamiento, quedando libre los cuatro esporozoitos que

penetran las células epiteliales. Cada esporozoito libre busca un enterocito, accediendo a través de la zona apical y quedando al margen del citoplasma. Una vez el esporozoito está en el interior se transforma en trofozoito, producto de la maduración del trofozoito que se encuentra rodeado por 4 membranas, las dos externas constituyen la membrana parasitófora, sufriendo una reproducción asexual (la esquizogonia o merogonia). El producto final son los 8 merozoitos según se trate del esquizonte, ya sea de primera o de segunda generación. Este proceso se repite al menos dos veces seguidas (Fig. 5) Mientras que la gametogonia consiste en una diferenciación sexual de macrogametocitos y microgametocitos a partir de los merozoitos que se encontraban en el esquizonte. Por la fusión de los gametos se forman entonces el cigoto y posteriormente el ooquiste. En la última fase, esporogonia, tiene lugar “*in situ*”, que conduce a la formación de ooquistes de pared delgada (20% del total) que se desenquistan dentro del hospedador, dando lugar a autoinfección endógena o retroinfección, y ooquistes de pared gruesa (80% del total), los cuales se excretan al medio externo (González y Suárez, 1991) . El ciclo desde la ingestión de ooquistes de *C. parvum* hasta la finalización del ciclo de vida endógeno y la excreción de ooquistes recientemente desarrollados (conocido como período pre-patente) puede variar de 4 a 22 días en humanos. Mientras que el período de la patente, o duración de la excreción de ooquistes, varía de 1 a 20 días para los humanos (Boulter-bitzer *et al.*, 2007).

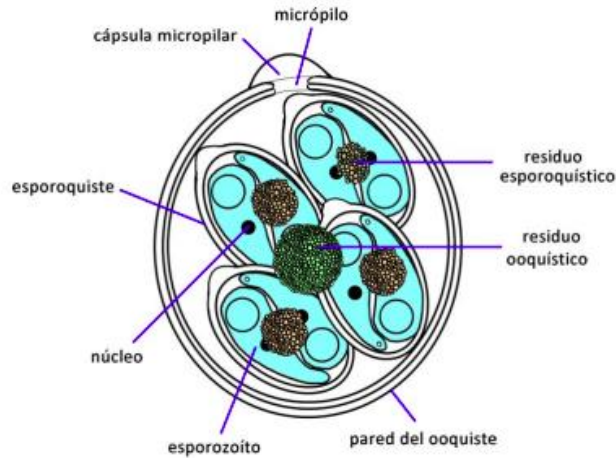


Figura 4. Esquema de un ooquiste esporulado. Fuente: Coccidios intestinales y tisulares (García *et al.*, 2008).

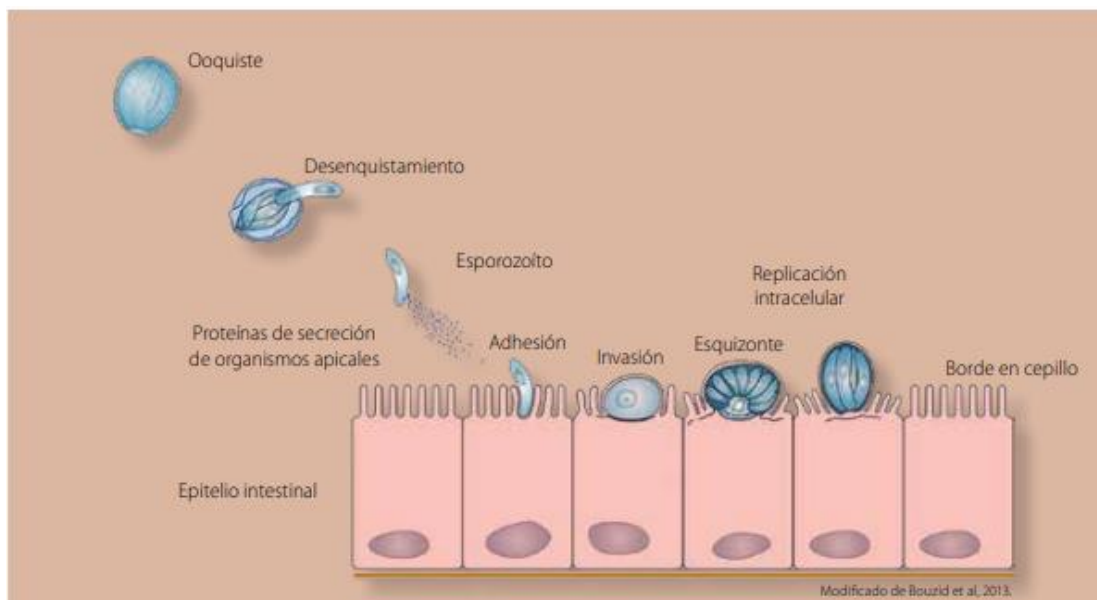


Figura 5. Invasión de *Cryptosporidium parvum* al epitelio intestinal. Fuente: El ciclo biológico de los coccidios intestinales y su aplicación clínica (García D. y Rivera F., 2017).

Resistencia ambiental

La pared del ooquiste, es rica en uniones de disulfuro, lo que le permite mantener la capacidad infectiva del parásito y le confiere una elevada resistencia a las condiciones ambientales y por tanto constituye una barrera protectora para los

esporozoítos. La temperatura es un factor de gran importancia en la supervivencia de los ooquistes debido a la composición proteica de su pared. Los ooquistes mantienen su viabilidad a temperaturas entre 4°C y 22°C, sobreviviendo a -20°C, pero disminuyendo su viabilidad. Temperaturas superiores pueden acelerar su tiempo de degradación, al igual que los procesos de descongelación rápida. La congelación a -70°C inactiva los ooquistes, incluso con crioprotectores (Del Coco *et al.*, 2009). Pueden ser infecciosos por al menos 6 meses, si se mantienen en ambientes húmedos y a temperaturas entre 0°C y 20°C. El tamaño de los ooquistes y su resistencia al cloro, frío y calor, facilita su transmisión a través del agua. Los ooquistes se destruyen a temperatura de 18°C durante mínimo 24 h y a las de 65°C durante al menos 30 min. Los ooquistes también son sensibles al peróxido de hidrógeno, ozono, radiación ultravioleta. Sin embargo, sobreviven al cloro y a muchos más desinfectantes del mercado (Cieloszyk, 2016).

La transmisión de ooquistes a través del medio ambiente, principalmente agua, se ve facilitada por el hecho de que son estables y pueden sobrevivir durante semanas o meses. Por ejemplo, (Pokorny *et al.*, 2002), encontraron que los ooquistes siguen siendo viables en el agua del río cuando se almacenaban a bajas temperaturas (4°C a 10°C). Además, el tratamiento de rutina de las aguas residuales elimina solo una pequeña fracción de los ooquistes (Boulter-bitzer *et al.*, 2007).

Los ooquistes de *C. parvum* también sobreviven a agua de mar durante largos períodos de tiempo, manteniéndose viables tras permanecer en oscuridad durante 35 días a 4°C (Robertson *et al.*, 1992). Otros autores determinaron que la temperatura no es un factor limitante, sin embargo, la salinidad, el tiempo y su

interacción en el medio acuático, si afectan la infectividad ooquistica. Estudios en ratones demostraron que cuando los ooquistes se encuentran a bajas salinidades, es cuando mayores probabilidades de infección existen. En ratones recién nacidos, los ooquistes mantenidos durante 40 días en agua de mar con salinidad del 35‰ a temperatura de 18°C eran infectantes. La humedad es otro factor ambiental que incide en la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* (Robertson *et al.*, 1992), demostraron que los ooquistes de *C. parvum* son susceptibles a la desecación y solo un 3% de ellos son viables, tras secarse una suspensión acuosa colocada en un portaobjetos, mantenida a temperatura ambiente (TA) durante 2 h. Mientras que, a mayores períodos de tiempo, se ocasiona practicamente una inactivación total (Gómez Couso, 2005).

Factor	Referencia	Método	Condiciones	Ooquistes
Temperatura	Fayer y col., 1996	IR	14 días; 30°C en agua	Infectantes
	Harp y col., 1996	IR	5 seg; 71,7°C en agua	No infectantes
	Fayer, 1994	IR	1min; >72,4°C en agua	No infectantes
			>2min; 64,2°C	No infectantes
			5min; 59,7°C	Infectantes
	Robertson y col., 1992	CV	152h; -22°C	<10% viables
	Fayer y Nerad, 1996	IR	1, 8 y 24h; -70°C	No infectantes
1, 3 y 5h; -20°C			Infectantes	
Desecación	Robertson y col., 1992	CV	4h; T ambiente	<1 viables
Agua				
Estéril	Olson y col., 1999	CV/IR	>12 semanas; -4°C	Viables e infectantes
	Jenkins y col., 2003	IR/CC	7 meses; 15°C	Infectantes
Desionizada	Fayer y col., 1998	IR	6 meses; 20°C	Infectantes
			7 días; 35°C	Infectantes
Del grifo	Robertson y col., 1992	CV	176 días; T ambiente	4% viables
De río	Robertson y col., 1992	CV	176 días; T ambiente	6% viables
	Pokorny y col., 2002	CC	1 semana; -20°C	No infectantes
			14 semanas; 4°C y 10°C	Infectantes
De mar	Robertson y col., 1992	CV	12 semanas; 21-23°C	<1% infectantes
	Fayer y col., 1998	IR	35 días; 4°C	62% viables
			4 semanas; 30‰; 20°C	Infectantes
Freire-Santos y col., 1999	IR	40 días, 35‰; 18°C	Infectantes	
Heces bovinas	Robertson y col., 1992	CV	176 días; T ambiente	34% viables
Heces humanas	Robertson y col., 1992	CV	178 días; 4°C	22% viables

CC, cultivo celular; CV, colorantes vitales; IR, infectividad en ratones; T, temperatura.

Figura 6. Efecto de diversos factores ambientales sobre la viabilidad/ infectividad de ooquistes de *C. parvum* (Gómez Couso, 2005).

Transmisión

El mecanismo de transmisión de los coccidios intestinales es por la ingesta de agua o alimentos contaminados con ooquistes esporulados (Fig. 7). Sin embargo, se ha reportado también infección por nadar en aguas contaminadas con heces o a través de la vía sexual por contacto oro-fecal. Para causar una infección se requieren un mínimo de 10^1 - 10^3 ooquistes en humanos (García D. y Rivera F., 2017).

Bastan 10 ooquistes para generar una infección, siendo esta la dosis infectante mínima que lo convierte en un microorganismo potencialmente transmisible hacia la población (Suarez *et al.*, 2020).

En los humanos, la fuente de contagio más frecuente es el agua, debido a que los ooquistes podrían permanecer viables durante 140 días.

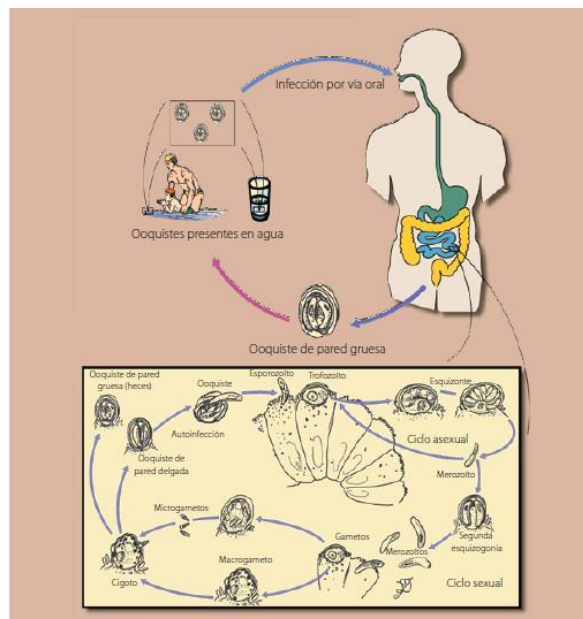


Figura 7. Ciclo de vida de *Cryptosporidium*. Fuente: El ciclo Biológico de los coccidios intestinales y su aplicación clínica (García y Rivera, 2017).

1.4.2.2. *Cyclospora cayetanensis*

Historia

Es un parásito protozoario mundialmente conocido como un patógeno humano emergente, agente causal de la ciclosporiasis, diarrea endémica y epidémica en el mundo (Sánchez O., 2017). *Cyclospora cayetanensis* fue inicialmente conocido como cuerpos semejantes a cianobacterias o cuerpos semejantes a coccidios, CLB por sus siglas de *Cyanobacterium-like body* o *Coccidian like bodies*. El nombre de coccidio se debe a sus investigadores, pertenecientes al departamento de Parasitología de la Universidad Cayetano de Heredia de Lima, Perú, lugar donde realizaron los diferentes estudios, también de la Asociación benéfica de PRISMA y de la Universidad John Hopkins, Baltimore (Rivera *et al.*, 1997).

En la década de 1980 se dieron a conocer los primeros casos de *Cyclospora*, con el surgimiento de la epidemia de SIDA, al encontrarse que *Cryptosporidium* era una de las infecciones oportunistas más comunes en pacientes con SIDA se realizó un mayor número de tinciones ácido resistentes, en donde fueron observados también los ooquistes de *Cyclospora*, que inicialmente eran confundidos con *Cryptosporidium* y en ocasiones como un artefacto (Ortega y Sanchez, 2010).

El primer reporte publicado de ciclosporiasis data del año 1979, en el que fue descrita la presencia de coccidios asociados a diarrea en dos niños y una mujer en Papúa, Nueva Guinea por Ashford, quien lo reportó como un parásito parecido a *Isospora*. Fue hasta 1993, que este parásito fue clasificado como *C. cayetanensis* por Ortega y col. (Piedrasanta, 2003; Reséndiz, 2017). El género

Cyclospora fue propuesto por Schneider en 1881, creando el género *C. glomerica* (Piedrasanta, 2003).

Taxonomía y clasificación

El subfilo Apicomplexa se subdivide en diferentes clases: Sporozoa que incluye a la subclase Coccidia y el orden Eucoccidiidae, subdividiéndose en tres familias, incluyendo la Familia Eimeriidae a la que pertenece *C. cayetanensis*. La familia Eimeriidae comprende 16 géneros, los cuales pueden distinguirse por el número de esporoquistes y esporozoitos dentro de los maduros (Piedrasanta, 2003).

La clasificación taxonómica de *C. cayetanensis* de acuerdo con la propuesta de la *International Society of Protistologists*, dice que en el rango Apicomplexa existen varios géneros muy relacionados que se conocen como coccidios, de los cuales 5 han sido descritos en humanos: *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, *Isospora*, *Cryptosporidium* y *Cyclospora* (Fig. 8). La descripción de otras especies de *Cyclospora* (*C. ceropitheci*, *C. colobi* y *C. papionis*) en primates inferiores, que producen también ooquistes pequeños y esféricos como *C. cayetanensis*, parece sugerir dos grupos distintos de *Cyclospora*; las especies que infectan insectívoros y roedores, que producen ooquistes grandes y subesféricos, y las que infectan los primates, incluyendo los humanos, que producen ooquistes pequeños y esféricos (Chacín-Bonilla y Barrios, 2011).

Se ha demostrado mediante distintos análisis filogenéticos que el género *Cyclospora* está íntimamente relacionado con el género *Eimeria*, que afecta principalmente a los pollos. Relación que permite poder predecir su especificidad con el hospedero.

Clasificación	Nombre	Rasgos biológicos
Supergrupo	Chromalveolata	Plástida endosimbiótica ancestral en forma de arco; pérdida o reducción secundaria de la plástida en algunos; con readquisición terciaria de una plástida en otros.
Primer rango	Alveolata	Alvéolos corticales; con microsporo; crestas tubulares o ampulosas.
Segundo rango	Apicomplexa	Complejo apical y vesículas subpeliculares; sexualidad por singamia y meiosis con progenie haploide, reproducción asexual por fisión binaria; endodiogenia, endopoliogenia o esquizogonia; locomoción por deslizamiento, flexión o flagelos.
Tercer rango	<i>Conoidasida</i>	Complejo apical completo; flagelos, si existen, en los microgametos; movilidad generalmente por deslizamiento; monoxenos o heteroxenos.
Cuarto rango	Coccidiasina	Los gametos maduros se desarrollan intracelularmente; el microgamonte produce numerosos microgametos; el cigoto rara vez es móvil; los esporoquistes se desarrollan en los ooquistes. <i>Cyclospora</i> : ooquistes con 2 esporoquistes, cada uno con 2 esporozoitos

Figura 8. Posición taxonómica *Cyclospora cayetanensis* según la propuesta taxonómica International Society of Protistology. Fuente: *Cyclospora cayetanensis*: biología, distribución ambiental y transferencia (Chacín-Bonilla y Barrios, 2011).

Biología, morfología y ciclo de vida

Mide de 8-10 μm , es una esfera indiferenciada que contiene una mórula. El ooquiste cuenta con una pared de dos capas. Presentan un cuerpo polar y un residuo de oocisto. Cuando ha esporulado, el ooquiste tendría dos esporoquistes (4 por 6.3 μm). Cada esporocisto contiene 2 esporozoitos que se ubican dentro del esporoblasto (1.2 μm por 9 μm) y se doblan en dos (Ortega y Sanchez, 2010). Dando como resultado 2 esporoblastos con 4 esporozoitos cada uno. Los individuos excretan ooquistes no esporulados en sus heces. Los ooquistes esporulan en el medio ambiente y toman más de una semana en esporular, requieren de 7 a 15 días para esporular (en condiciones ideales a temperaturas entre 23° y 27°C), donde se vuelven infecciosos en algún huésped susceptible. Cuando este huésped, ingiere alimentos o agua contaminada con ooquistes infecciosos, estos se enquistan y los esporozoitos se liberan para infectar las células epiteliales del duodeno y yeyuno. La multiplicación asexual da como

resultado merozoitos de tipo I y II, que se diferencian en estadios sexuales o gametocitos (Fig. 9). El macrogametocito es fertilizado por el microgametocito y produce un cigoto. Los ooquistes se forman y excretan al medio ambiente como esporoquistes no esporulados (Ortega y Sanchez, 2010).

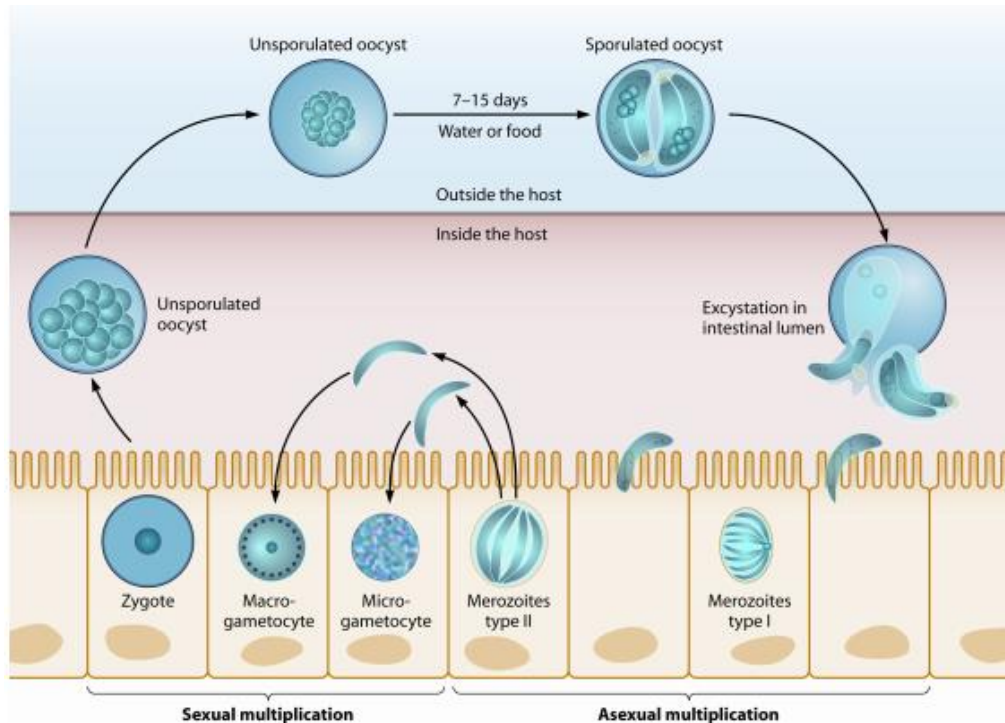


Figura 9. Ciclo de vida de *Cyclospora cayetanensis*. Fuente: Actualización sobre *Cyclospora cayetanensis*, un parásito transmitido por alimentos y el agua (Ortega y Sanchez, 2010).

Resistencia ambiental

Las condiciones ambientales necesarias óptimas, no son del todo conocidas. Dependiendo de las condiciones climáticas, requieren de pocos días a semanas para madurar y transformarse en ooquistes. Sin embargo, se conoce que los ooquistes son muy sensibles a la desecación de sus paredes, que se rompen a partir de los 15 min. Además, son muy resistentes a los desinfectantes, incluido el cloro a las concentraciones usadas para el tratamiento de agua. Pueden sobrevivir

en el agua a 4°C por dos meses, a 37°C por 7 días. Los ooquistes no pueden ser inducidos a esporular después de la congelación a -18°C durante 24 h y al calentamiento a 60°C por 1 h. El agua facilita el desarrollo y transmisión de los ooquistes de los coccidios. En varios países, se ha descrito una variación acentuada en la prevalencia de la infección de acuerdo a la época del año. Sin embargo este comportamiento es muy variado en distintas regiones. En la mayoría de las naciones, la prevalencia de la infección se incrementa durante la estación lluviosa y caliente (Chacín-Bonilla y Barrios, 2011).

1.4.3. Filo Sarcomastigophora: Flagelados

Los sarcomastigóforos abarcan a los protozoos que típicamente poseen un núcleo de endosoma caracterizado por un anillo de cromatina nuclear alrededor de una región central libre de cromatina, y que son móviles ya sea por la existencia de flagelos (Mastigophoros) o por pseudópodos (Sarcodinos) (Anónimo, 2011).

Los mastigóforos o flagelados, poseen típicamente uno o varios flagelos en las formas activas (trofozoitos), a excepción de los Heterocariota Fofaminiferida, que poseen flagelos, pseudópodos o ambos. La mayoría de estos organismos poseen un núcleo, aunque algunos pocos son multinucleados. Los flagelados sin kinetoplasto tienen un ciclo biológico simple con fases de quiste y trofozoito, como es el caso de *Giardia intestinalis*. Hay flagelados de vida libre y otros que son patógenos. Entre los patógenos podemos diferenciar tres grupos de flagelados: patógenos urogenitales, hemoflagelados y patógenos gastrointestinales como lo es *Giardia intestinalis* (Simmons, 2008).

1.4.3.1. *Giardia intestinalis*

Historia

Es un protozoo flagelado que afecta al humano desde tiempos históricos, afectando a todos los grupos etarios, siendo los niños los más perjudicados, estimándose que el 12% de las enfermedades de la niñez se deben a parasitosis intestinales, siendo *G. intestinalis* uno de los parásitos más frecuentes en el mundo, con prevalencia elevada en países pertenecientes al trópico húmedo (Machado Lemus, 2014; Rodriguez, 2012). En 1681, quistes de *Giardia* fueron descritos por primera vez por Van Leewenhoek, mientras examinaba sus propias heces bajo el microscopio. Más tarde fue descrito detalladamente por Vilein Lamb en 1859, quien pensó que pertenecía al género *Cercomonas* y lo denominó *Cercomonas intestinalis*. Aunque durante mucho tiempo se pensó que era un comensal, no fue sino hasta la década de 1960 que se comienza a conocer que produce diarreas y síndrome de mala absorción en humanos (Adam, 2001; Rodriguez, 2012). En 1882 Kunstler le otorgó el nombre de *Giardia*, más tarde, en 1888 Blanchard propuso *Lambliia intestinalis* y Stiles eligió *Giardia duodenalis*. Mientras que Kofoid y col. en 1915, propusieron el nombre *Giardia lamblia*. A partir de 1970, se aceptó el nombre de *Giardia intestinalis* para este parásito, aunque algunos autores utilizan sinónimos como *G. duodenalis* o *G. intestinalis* (Molina, 2009). Estudios de secuenciación del gen que codifica la subunidad pequeña o 18S ARNr (SS ARNr), utilizados en los sistemas actuales de clasificación molecular de los microorganismos eucariotas, señalan a *Giardia* sp. como el organismo eucariota más primitivo conocido en la escala evolutiva entre los eucariotas y procariotas (Alcaraz S., 1995).

Taxonomía

G. intestinalis es un protozoo flagelado que ha sido clasificado de la siguiente manera:

Reino: *Protozoa*

Organismos unicelulares sin pared celular externa rígida; con orgánulos membranosos: núcleo, vacuolas, mitocondrias, aparato de Golgi, lisosomas.

Filo: *Sarcomastigophora*

Protozoos que presentan un solo tipo de núcleo. Poseen flagelos, pseudópodos o ambos tipos de orgánulos locomotores

Subfilo: *Mastigophora*

Organismos que poseen típicamente uno o más flagelos, reproducción asexual, principalmente por fisión binaria; en algunos grupos presentan reproducción sexual.

Clase: *Zoomastigophora*

Organismos sin cloroplastos, formas ameboides con o sin flagelos en algunos grupos.

Orden: *Diplomonadida*

Flagelados bilateralmente simétricos, con dos núcleos, cada uno de los cuales está asociado a un número de flagelos que oscila entre uno a cuatro. Sin mitocondrias. Pueden ser parásitos o de vida libre.

Familia: *Hexamitidae*

Organismos con seis a ocho flagelos y algunas veces axostilos y cuerpos medianos o parabasales.

Género: *Giardia*

Poseen un disco adhesivo o suctorio, el que sirve como un orgánulo para la fijación, en la superficie ventral del trofozoito.

Especie: *Giardia lamblia* Es la única especie del género que ha sido descrita en humanos.

Actualmente, son aceptados por la mayoría de los investigadores 6 especies de *Giardia*, basándose en la morfología de los trofozoitos y/o quistes. Comprenden *G. agilis* en anfibios, *G. ardeae* y *G. psittaci* en aves, *G. microti* y *G. muris* en roedores y *G. duodenalis* en mamíferos. *Giardia duodenalis* (sin. *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*) siendo esta la única especie que encontramos en humanos, aunque también se encuentra en otros mamíferos, incluyendo mascotas y ganado (Ryan y Cacciò, 2013). Es posible que una única especie de *Giardia* spp. también este presente en réptiles, ya que se encontró en las lagartijas un parásito similar a *G. duodenalis*. Sin embargo, este parásito carecía de cuerpos medianos y tenía quistes binucleados, y se considero *G. varani* (Yaoyu y Xiao, 2011).

Morfología y ciclo biológico

El ciclo biológico de *G. intestinalis* incluye dos estados o fases: el trofozoito que es la forma vegetativa y quiste que es la forma de resistencia e infectante (Fig. 10).

El trofozoito es piriforme, mide de 12-15 μm x 5-9 μm , con una cara concava y otra convexa, aplanado en sentido dorsoventral. El citoesqueleto incluye un cuerpo medial o axostilo, que son componentes del citoesqueleto que están localizados en la línea media del trofozoito y son el sitio de ensamble de los microtúbulos del

disco ventral; posee cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral) que originan de cuatro pares de cuerpos basales en la cara ventral del trofozoito con sus correspondientes axonemas y un disco ventral o disco succionario que se encuentra implicado en la adherencia al epitelio intestinal. Las proteínas constituyentes de este disco son las giardinas, que son un grupo de proteínas de conformación alfa hélice, también contiene proteínas contráctiles como actinina, miosina y tropomiosina que constituyen la base bioquímica para la contracción y adherencia, y las tubulinas que son proteínas que constituyen los microtúbulos del disco ventral y de los flagelos. Además, posee dos núcleos ovoides, situados simétricamente a cada lado de la línea media, unidos entre sí por los rizoplastos que terminan en el extremo anterior al axostilo, en dos blefaroplastos, con un gran cariosoma central, retículo endoplasmático y vesículas periféricas tipo lisosoma (PV) (Adam, 2001; Rodríguez, 2012).

El quiste es ovalado, de doble membrana, con dos a cuatro núcleos y algunas de las estructuras descritas para el trofozoito, de las cuales es notorio el axostilo; mide entre 8--12 μm de longitud y 7 a 10 μm de ancho (Rodríguez, 2012). Cubiertos por una pared de 0,3 - 0,5 μm de espesor y compuesta por una capa filamentosa externa y una capa membranosa interna con dos membranas. La parte exterior de la pared del quiste está cubierta por una red filamentosa de 7 - 20 nm. Se han identificado cuatro proteínas principales en la pared externa del quiste. El componente de azúcar de la porción externa es predominantemente galactosamina en forma de Nacetilgalactosamina (GalNAc). Como son la forma ambientalmente estable del ciclo de vida, los quistes tienen una masa metabólica de solo el 10% al 20% de la que se encuentra en los trofozoitos. La respiración de

los quistes como los trofozoitos es estimulada por el etanol, mientras que en los trofozoitos son estimulados por la glucosa (Adam, 2001). En el citoplasma del quiste se observan también ocho axonemas, seis de ellos localizados en el área central y dos en la periferia. Asociados a los axonemas se encuentran dos láminas de microtúbulos, paralelos a los axonemas centrales; cada una de estas láminas se encuentran formadas por 10 a 20 microtúbulos, que probablemente representan al axostilo descrito con el microscopio óptico. Los quistes inmaduros o recién formados tienen dos núcleos y se denominan prequistes y los quistes maduros son tetranucleados. Los núcleos se suelen localizar en la parte central del quiste (Alcaraz, 1995).

Giardia posee un ciclo de vida monoxeno, bifásico en que la fases de trofozoito alterna con la fase de quiste. Cuando el hospedero susceptible ingiere los quistes de *G. intestinalis*, ocurre el desenquistamiento que se inicia en el estómago y se completa en el duodeno, como resultado de la exposición al pH ácido del estómago y a las enzimas pancreáticas quimiotripsina y tripsina, liberando dos trofozoitos por quiste. Los trofozoitos se adhieren a la mucosa duodenal y al yeyuno proximal donde se reproducen asexualmente por fisión binaria longitudinal. Durante períodos de diarrea, estos trofozoitos pueden ser transportados con el contenido intestinal y ser excretados, pero no sobreviven largos períodos de tiempo fuera del hospedero. Algunos de los trofozoitos pueden enquistarse en el ileon, posiblemente como resultado de la exposición a sales biliares o a la ausencia de elementos nutritivos como el colesterol. Después que los quistes del parásito son eliminados con las heces al ambiente, tienen

capacidad de infectar por la vía oral-fecal a otro mamífero susceptible o de reinfectar al mismo hospedero (Rodríguez, 2012).

Resistencia ambiental

Los quistes de *Giardia sp.* son sensibles a la desecación. Resisten a 8°C por 77 días, a 21°C por 5 - 24 días y a 37°C en agua destilada por 4 días. El agua hirviendo destruye los quistes rápidamente al igual que las soluciones de fenol, amonio cuaternario y Lysol (Machado Lemus, 2014). En el agua de mar, los quistes de giardia pueden sobrevivir durante más de 65 días a 4°C (Yaoyu y Xiao, 2011).

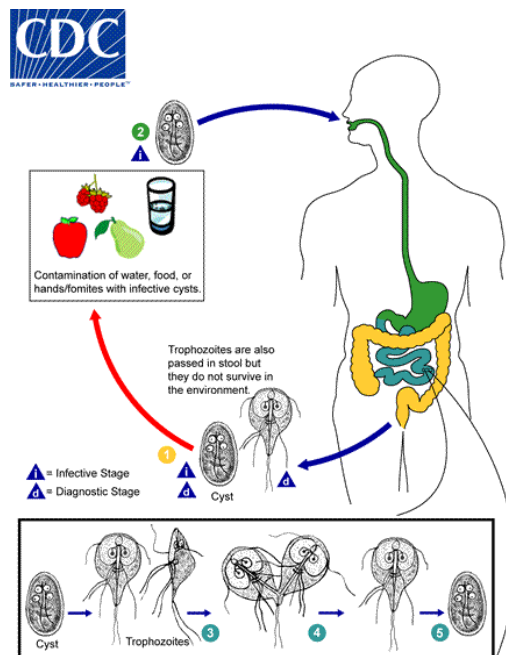


Figura 10. Ciclo de vida de *Giardia intestinalis*. 1. La infección se produce por la ingestión de quistes en agua o alimentos contaminados o por la vía fecal-oral (manos o fómites). 2. En el intestino delgado, la excisión libera trofozoitos 3. por fisión binaria longitudinal, permaneciendo en la luz del intestino delgado proximal donde pueden estar libres o adheridos a la mucosa por un disco succesor ventral. 4. Se produce cuando los parásitos transitan hacia el colon. 5. Debido a que los quistes son infecciosos cuando se eliminan en las heces o poco después, es posible la transmisión de persona a persona. Fuente: Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2020).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Identificar la presencia de protozoos intestinales en muestras de bivalvos de importancia comercial en el Golfo de Panamá, Panamá

Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* y *Giardia intestinalis* en bivalvos que son utilizados para la venta y consumo en en el Golfo de Panamá, Panamá
- Comparar la presencia de ooquistes y quistes de protozoos en tres distintas especies de bivalvos (*Anadara* spp., *Leukoma* spp., *Donax* spp.) colectadas en tres puntos distintos del Golfo de Panamá, Panamá

HIPÓTESIS

Existe gran cantidad y diversidad de protozoos en bivalvos durante la temporada lluviosa en el Golfo de Panamá

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. RECOLECCIÓN

Las muestras se obtuvieron de la misma manera que un consumidor tradicional, en puntos de venta, donde previamente son recolectadas por los vendedores, enfocándonos en tres zonas de importancia comercial, ubicadas en el Golfo de Panamá. Posteriormente, se trasladaron en cadena de frío hasta el Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y Laboratorio de Microbiología de Aguas (LAMA) de la Universidad de Panamá, para su procesamiento.

El período de recolección y procesamiento fue de septiembre 2019 a noviembre 2019. Trabajando cada semana muestras de una playa diferente, estudiando un bivalvo en cada zona, durante los tres meses (Tabla 5).

1.1.2. Características generales del área de estudio

El Golfo del océano Pacífico, se encuentra localizado en la costa suroriental de Panamá, 8°05'11"N 79°16'58"O. Cuenta con una anchura de 250 km y una profundidad de 220 metros. Mantiene una amplia diversidad de peces y especies marinas.

Sitio 1. Playa de Bique

Ubicada en el corregimiento de Cerro Silvestre, distrito de Arraiján, Provincia de Panamá Oeste, obtención de *Prothotaca spp.* Ecosistemas ubicados en el Golfo de Panamá, Panamá.

Sitio 2. Bahía de Chame

La región de Chame, está ubicada en la parte occidental de la provincia de Panamá Oeste, en la estribación oriental de la cordillera Central en la vertiente del Pacífico, a unos 65 km. al oeste de la Ciudad de Panamá, Panamá.

Sitio 3. Playa Chinina, Chepo

Playa Chinina está localizada en el corregimiento de Santa Cruz de Chinina, perteneciente al distrito de Chepo, Panamá.



Figura 11. Localización geográfica de los puntos tres puntos de obtención de las muestras: Bahía de Chame, Playa Bique, Santa Cruz de Chinina.

1.2. MATERIALES

- Solución Buffer Fostato, pH 7.2
- Solución Buffer – Acetato de Etilo
- Solución Buffer Fosfato Peptona
- Solución sobresaturada de Sucrosa, densidad 1.27
- Solución H₂SO₄ al 1 y 5%
- Lugol
- Suero bovino
- Carbofucsina

- Azul de metileno alcalino de Loeffler
- Safranina
- KOH 5.6%
- Glicerol 40X
- Alcohol metílico
- Agua libre de nucleasas
- Colorante Giemsa
- Formalina

1.3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Inicialmente las almejas fueron sometidas a un proceso de limpieza externa con un cepillo rígido y agua potable, para eliminar las impurezas de la concha y así proceder a extraer el material, utilizando un cuchillo estéril para obtener el cuerpo y líquido intervalvar. De los cuales se obtuvieron 5 muestras de 100 g cada una, para posteriormente, licuar por separado y en intervalos de 5 s hasta lograr una mezcla homogénea, trabajando cada 100 g de muestra en proporción 1:1 con Buffer fosfato [1.25 ml de KH_2PO_4 (1 N NaOH a pH 7.2) + 5.0 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$] (Canadian Food Inspection Agency, 2011). Después del licuado, se procedió a depositar en frascos de vidrio estériles.

De cada porción obtenida, se colocó en un frasco estéril 60 g de muestra, que pasó a ser mezclado con 10 mL de Buffer Fosfato-Peptona, previamente esterilizado para obtener una muestra ligera y luego pasar por vortex a 3 000 rpm durante 10 min.

Cada muestra fue filtrada por doble gasa estéril, con dos cedazos finos y en el filtrado obtenido fue separado en 4 tubos de centrifuga tipo Falcon de 50 mL.

1.4. LIMPIEZA DE LA MUESTRA

A cada tubo se le añadió 15 mL de una solución Buffer Acetato de Etilo, en proporción de 2:1 e inmediatamente se centrifugaron las muestras a 3000 rpm a 4°C durante 10 min. Pasado este proceso, el sobrenadante fue descartado y el sedimento lavado con 15 mL de Buffer Fosfato-Peptona y para ser centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones. Este proceso se realizó para limpiar cualquier residuo de Acetato de Etilo, para evitar que este deteriorara la muestra. Cada tubo (5 muestras) se preservó empleando diferentes técnicas, para ser utilizados en análisis posteriores.

1.4.1. Técnica de concentración por flotación

Implica la flotación de las muestras, empleando a través de la técnica de Sheater Sugar, con la finalidad de separar los ooquistes y quistes de protozoos presentes en la muestra. Para este proceso se tomó una porción de dicha muestra y se le añadió una solución sobresaturada de sucrosa con una densidad de 1.27 y la cual fue centrifugada a 3000 rpm a 4°C durante 5 min. Para luego obtener 1.5 – 2.0 mL del sobrenadante de cada muestra con la ayuda de una micropipeta de 5 mL y se procedió a depositar en tubos para centrifuga de tipo Falcon de 15 mL. Para la observación microscópica de estas muestras se utilizó la solución de Lugol, como colorante de contraste.

1.4.2. Técnica de concentración por filtración

Se resuspendió la muestra con una solución de Buffer- Fosfato + Peptona y se filtró a través de filtro de 0.18 μm , para que los quistes y ooquistes de los parásitos

quedaran en el filtro y se pudieran observar las muestras más limpias y obtener mejores fotografías de los parásitos reportados.

1.5. PRESERVACIÓN

1.5.1. Preservación con formalina al 10%

Una porción de las muestras obtenidas fue resuspendida en formalina al 10% para su preservación. Esta muestra se utilizó para realizar la tinción de ácido alcohol resistente modificada, Tinción de Giemsa y Tinción Koster.

1.5.1.1. Tinción de Ziehl-Neelsen

La tinción de ácido alcohol resistente o tinción de Ziehl-Neelsen, se utiliza para confirmar la presencia de *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora* spp. Esta técnica nos ayuda a colorear los ooquistes de los esporozoos de color rosado pálido a rojo con el fondo de color azul. Se utilizó el protocolo del Atlas de Parasitología Humana (Ash y Orihel, 2010). Para la fijación del frotis se utilizó suero de sangre bovino, que se obtiene al centrifugar la sangre a 3000 rpm durante 10 min. Luego, se colocó un poco del suero en el portaobjetos con la ayuda de un palillo estéril y sobre ella se puso un poco de la muestra, se dejó secar el frotis al aire para luego ser fijado con metanol absoluto durante 10 min (dejar secar el portaobjeto). El portaobjeto se colocó en un escurridor de tinción y se llenó con tintura de Carbolfucsina, para calentar y evaporarlo a fuego bajo con un mechero de Bunsen o una lámpara de alcohol. Posteriormente, el portaobjetos se dejó enfriar y se lavó con agua corriente, para ser sumergido en solución decolorante acuoso de ácido sulfúrico al 5% durante 1 min y nuevamente lavarlo con agua corriente. Pasado esto, se sumergió el preparado en azul de metileno alcalino de Loeffler como colorante de contraste durante 1 min, para lavar el portaobjetos nuevamente con

agua corriente. Por último, se examinó el preparado sin medio de montaje, ni cubreobjetos.

1.5.1.2. Tinción de Giemsa

La tinción de Giemsa, que tiene como objetivo colorear los parásitos flagelados presentes en la muestra, ya que empleamos el líquido intervalvar, lo cual facilita la presencia de formas móviles (trofozoitos) de protozoos, como en el caso de *Giardia intestinalis* (Ash y Orihel, 2010). Para fijar el frotis se utilizó suero bovino, proceso descrito antes. Al obtener este suero, con ayuda de un palillo estéril, se colocó un poco en el portaobjetos y se mezcló con la muestra.

Se dejó secar el frotis al aire libre para luego ser fijado con metanol absoluto durante 10 min. Colocando el portaobjetos en un escurridor de tinción y se llenando con colorante de Giemsa durante 10 min. Finalmente, el portaobjetos se lavó con agua corriente y se dejó secar.

1.5.1.3. Tinción de Koster

Se realizó un frotis de la muestra y se dejó secar al aire, posteriormente se fijó con alcohol metílico de 2 - 5 min, se dejó secar en un mechero hasta que el alcohol se quemara. Se tiñe durante 5 min con una mezcla de solución 2:5, de safranina y solución KOH al 5.6%. Se lavó con agua y se diferencia en H₂SO₄ al 1% durante 10 s, se lavó con agua corriente, para luego ser sumergido en solución acuosa de verde malaquita al 5% durante 10 a 15 s, realizando un último lavado con agua (Castro y Guerrero Bermudez, 2004).

1.5.2. Preservación de la muestra con glicerol al 20x

A una fracción del sedimento obtenido, se le agregó 500 µL de agua libre de nucleasas y se separaron en 5 submuestras de 100 µL cada una, en tubos

Eppendorf de 1.5 mL y luego, se le agregó a cada muestra glicerol a 40x en proporción 1:1. Por último, las muestras se guardaron en el congelador a 80°C, para su posterior análisis.

1.6. ESTADISTICA

Para el análisis de nuestros resultados, se utilizó la prueba de Ji-cuadrado (o chi cuadrado) con la distribución de Pearson, para someter a prueba la frecuencia en la que encontramos los protozoos en estudio (*Cyclospora* spp., *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp.), en cada bivalvo. Así como también, la frecuencia de protozoos en general por mes de estudio.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

Se analizaron 45 muestras de 3 géneros de moluscos bivalvos (*Anadara* sp., *Leukoma* sp. y *Donax* sp.), 5 por género por mes, recolectadas en el Golfo de Panamá durante la temporada lluviosa de 2020 (septiembre a diciembre) (Tabla 3).

Se determinó que si hay diferencia significativa entre los géneros *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp. ($X^2 = 24.4$, $p < 0.0001$). Se encontró 100% de la presencia de estos dos protozoarios en *Anadara* sp. y *Leukoma* sp. durante el mes de octubre, y en *Anadara* sp. durante el mes de diciembre. Sin embargo, no hay diferencia significativa entre los 3 géneros de moluscos bivalvos parasitados ($X^2 = 0.54$, $p < 0.760$). A su vez, se estableció diferencia significativa en la frecuencia de la presencia de parásitos, con relación al mes de muestreo ($X^2 = 15.61$, $p < 0.0004$), viéndose que durante el mes de octubre hubo mayor porcentaje de presencia de parásitos en general ($X^2 = 10.33$, $p < 0.0013$).

También, se encontró diferencia significativa en la frecuencia de *Giardia* sp. durante los meses de muestreo ($X^2 = 45$, $p < 0.0001$). La presencia de *Giardia* sp. mediante la Tinción de Giemsa, fue de un 20% durante los meses de octubre y noviembre en *Anadara* sp. No se detectó en los demás géneros de moluscos bivalvos en cada mes muestreado (Fig. 12).

La presencia de *Cryptosporidium* sp. mediante la Tinción de Zielh Neelsen fue de 100% en *Anadara* sp. durante los meses de octubre y noviembre. En el caso de *Leukoma* sp. y *Donax* sp., tuvieron su mayor porcentaje durante el mes de octubre

100% y 80%, respectivamente, y fue en descenso hacia el mes de noviembre, llegando a un 20% y 40%, respectivamente (Fig. 13).

La menor frecuencia de *Cyclospora* sp. se encontró en *Donax* sp., estando ausente durante los meses de septiembre y noviembre, y detectando solo un 20% para el mes de octubre. En el caso de *Anadara* sp. y *Leukoma* sp. se vieron parasitados en los meses de septiembre y octubre, y sin detección durante el mes de noviembre (Fig. 14). Se encontró lo contrario con *Cryptosporidium* sp. en *Donax* sp., que tuvo una tendencia de mayor frecuencia hacia el mes de noviembre. Durante el mes de octubre, se observó una tendencia de muestras positivas para las tres especies de moluscos bivalvos analizadas (Fig. 13). La frecuencia de *Cryptosporidium* sp. en *Leukoma* sp. mediante la técnica del montaje directo y durante el mes de octubre fue de un 20%, y en contraste, con la técnica de Flotación fue de un 100%, y esta fue la frecuencia más alta observada con esta técnica durante los 3 meses de estudio (Fig. 15). En el caso de *Cyclospora* sp., la frecuencia más alta registrada se encontró en *Anadara* sp. mediante la técnica de montaje directo, durante el mes de octubre (Fig. 16). De la misma forma, *Giardia* sp. fue encontrada con mayor frecuencia en *Anadara* sp. mediante la técnica de montaje directo, durante el mes de octubre, y en contraste, se encontró con menor frecuencia en *Donax* sp. mediante la técnica de montaje directo, durante los tres meses de muestreo (Fig. 17).

La técnica de flotación no favorece la observación de *Giardia* sp. Durante el mes de noviembre se observó una alta frecuencia en la presencia de *Giardia* sp. en *Anadara* sp. con un 80% mediante montaje directo (Fig. 17), mientras que con la

técnica de Giemsa se observó una frecuencia de 20%, en este mismo género de bivalvo, pero observándose su ausencia en los demás géneros (Fig. 12)

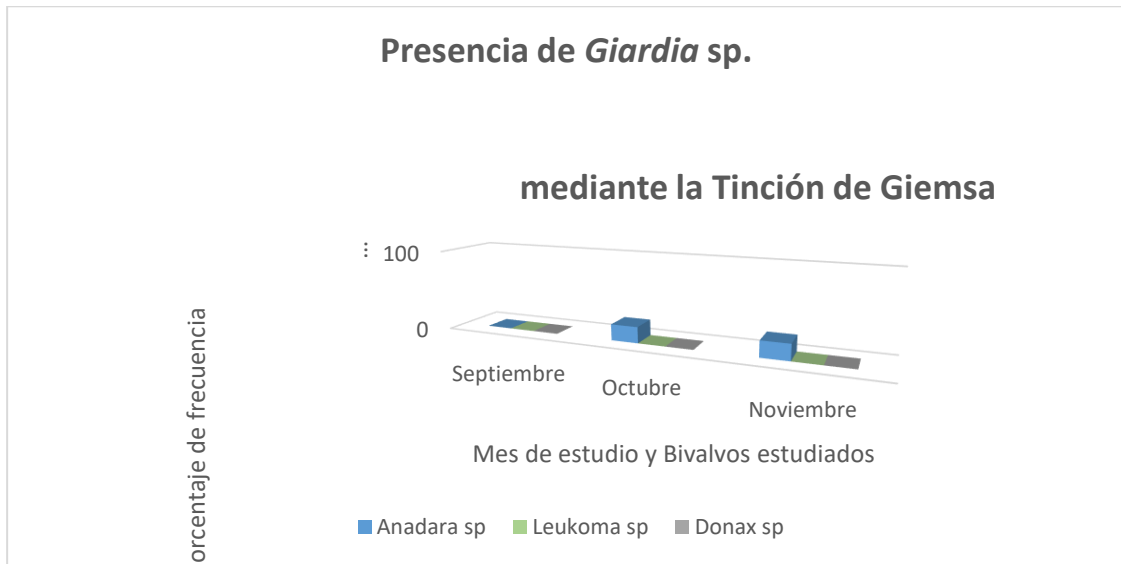


Figura 12. Presencia de *Giardia* sp. en los moluscos bivalvos analizados durante los meses de estudio.

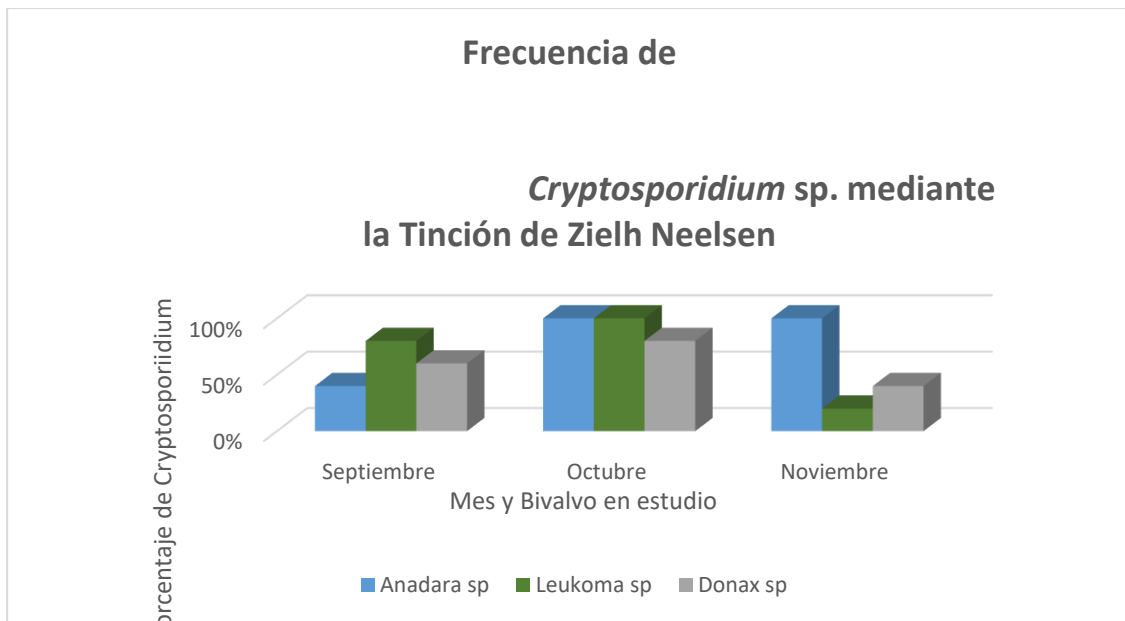


Figura 13. Frecuencia de *Cryptosporidium* sp. mediante la Tinción de Zielh Neelsen en los moluscos bivalvos analizados durante los meses de estudio.

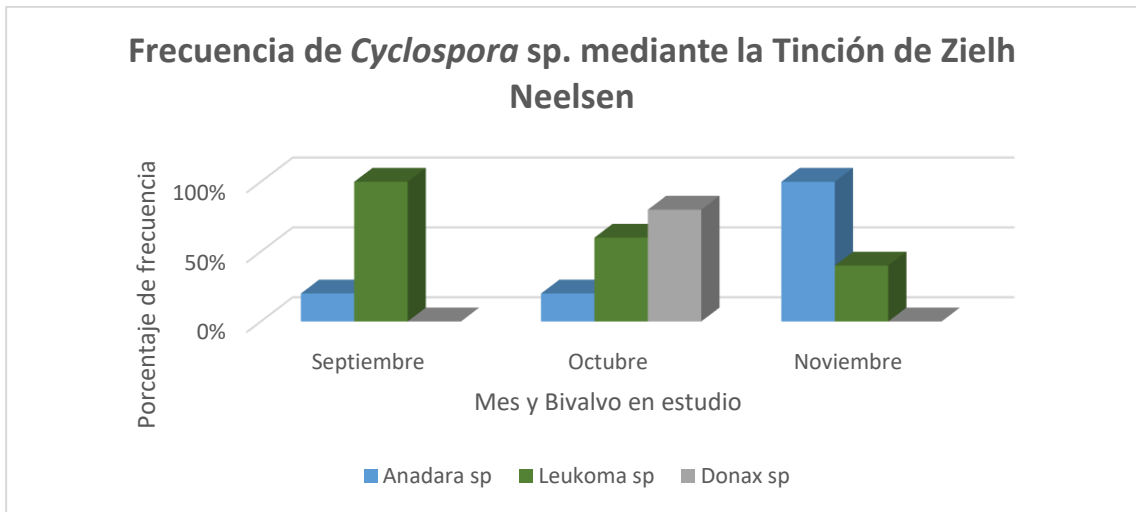


Figura 14. Frecuencia de *Cyclospora* sp. mediante la Tinción de Zielh Neelsen en los moluscos bivalvos analizados durante los meses de estudio.

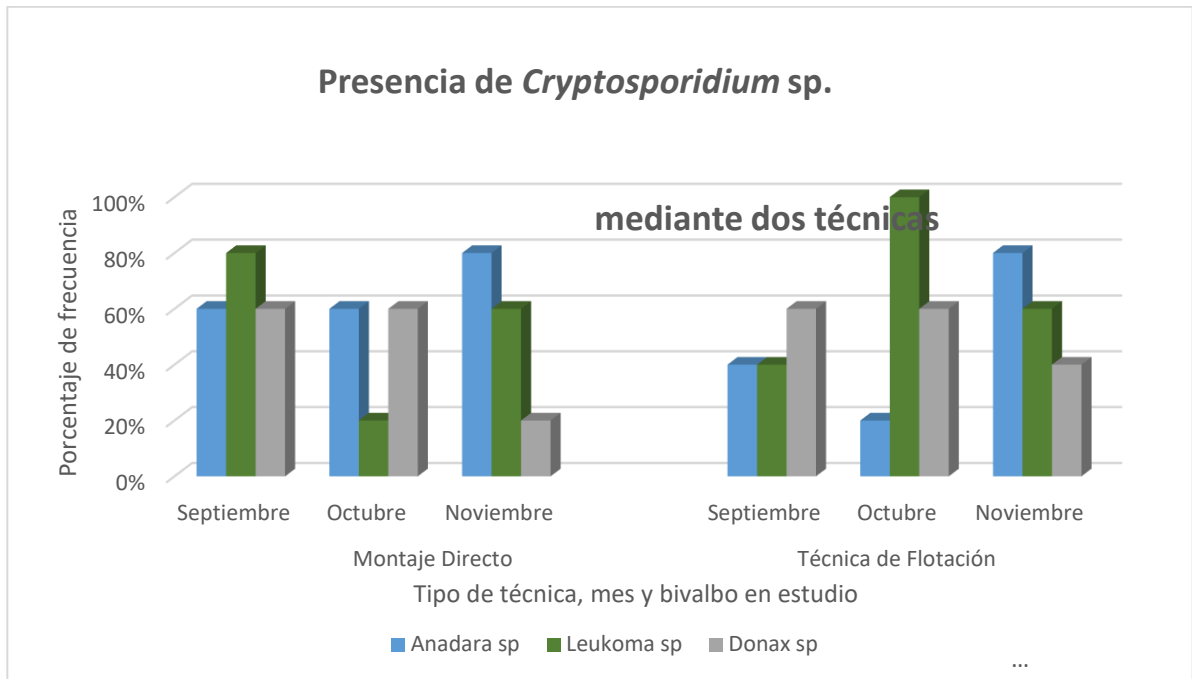


Figura 15. Frecuencia de *Cryptosporidium* sp. mediante las técnicas de montaje directo y flotación en los moluscos bivalvos analizados durante los meses de estudio.

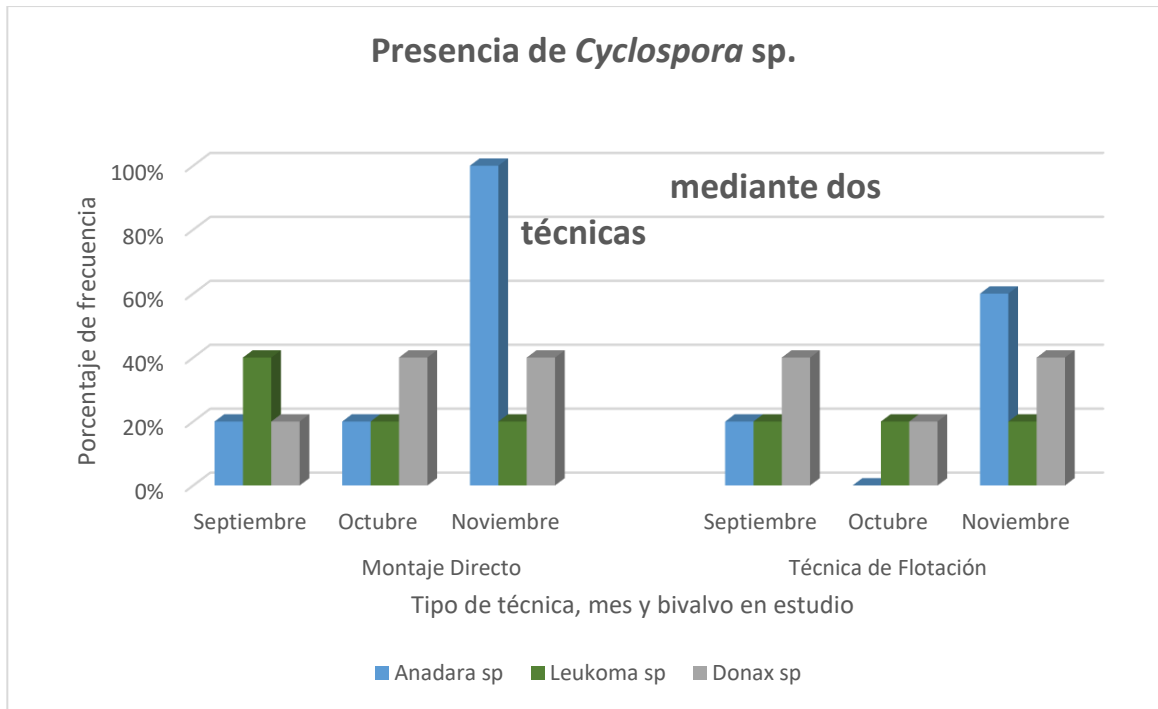


Figura 16. Frecuencia de *Cyclospora* sp. mediante las técnicas de montaje directo y flotación en los moluscos bivalvos analizados durante los meses de estudio.

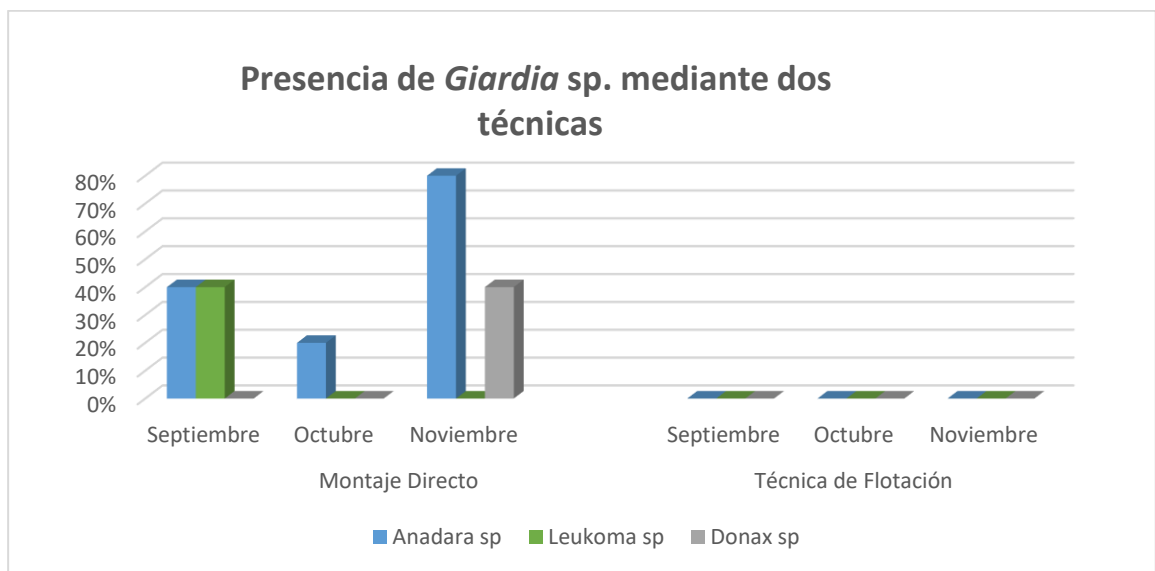


Figura 17. Frecuencia de *Giardia* sp. mediante las técnicas de montaje directo y flotación en los moluscos bivalvos analizados durante los meses de estudio.

DISCUSIÓN

Este es el primer reporte de *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora* sp. y *Giardia* sp., en bivalvos de importancia comercial del Golfo de Panamá, proporcionando evidencia de la presencia de estos parásitos patógenos en bivalvos de los géneros *Leukoma* sp., *Anadara* sp. y *Donax* sp. Los resultados sugieren que estos moluscos bivalvos son capaces de albergar estos parásitos protozoos, siendo así un posible vehículo de transmisión a sus depredadores y la población consumidora en general. Se ha demostrado que las aguas marinas están contaminadas ya sea por las escorrentías, falta de tratamiento de las aguas residuales, etc. Se observó en un estudio realizado por Robertson *et al.* (1992), que ooquistes de *C. parvum* encontrados en agua de mar natural y almacenados a 4°C en oscuridad, permanecieron viables durante 35 días, lo que sugiere que, en condiciones normales, esto proporcionaría un período suficiente para una exposición potencial en humanos y animales marinos. Aunque hubo un aumento significativo en el porcentaje de ooquistes muertos, una gran proporción sobrevivió, por lo que no se descarta la capacidad de contraer Cryptosporidiosis por ingestión accidental mientras se está en el mar (Robertson *et al.*, 1992). Además, recientes estudios en la Región del Bío Bío, Chile, reportaron por primera vez la presencia de *C. parvum* en costas chilenas en ejemplares de cholga (*A. ater*) (16.4%) (Suárez *et al.*, 2020). También, en Hawuái, se encontraron quistes de *Cryptosporidium* sp. y *Giardia* sp. en aguas cerca de una playa con actividades de recreo (Johnson *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha reportado ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en mejillones *Mytilus edulis*, de las costas de Normandía, Francia, en donde ase

demonstró que los números más altos de ooquistes fueron encontrados en enero y los más bajo en octubre (Li *et al.*, 2006), difiriendo con los resultados encontrados en este estudio, por ser un clima tropical. También, se han reportado presencia de *Cryptosporidium* sp. en Ostras (*Crassostrea virginica*) de la bahía de Chesapeake, EEUU, en donde se analizaron en aguas de mar artificial a diferentes concentraciones de salinidad, teniendo como resultados que a 10, 20 y 30 ppt a 10°C y a 10 ppt a 20°C fueron infecciosos después de 12 semanas. Los colocados en agua de mar a 20 ppt y 30 ppt a 20°C, fueron infecciosos durante 8 y 4 semanas, respectivamente, mientras que no se presentó presencia de *Giardia* sp. mediante este método (Fayer *et al.*, 1998). Esto también nos indica, que las muestras infectadas por *Cryptosporidium* sp. encontradas en este estudio, podrían ser infecciosos, implicando un importante problema de salud pública para las personas que consumen estos moluscos bivalvos crudos o mal cocidos. Otros autores han reportado una mayor incidencia de *Cryptosporidium* sp. en época lluviosa, por lo que sería bueno considerar que, entre septiembre y noviembre, siendo octubre el mes con mayor precipitación (Gómez Couso, 2005), similar a lo observado en este estudio.

Un estudio en *Mytilus galloprovincialis*, moluscos comestibles de la costa en la provincia de Izmir, Turquía, se determinó que al menos 6 de 7 sitios de muestreo estaba contaminado por al menos un parásito y un 26.4%, dio positivo para *Cyclospora cayetanensis* (Aksoy *et al.*, 2014), muy parecido a lo observado en este estudio.

Los moluscos bivalvos representan un riesgo a la salud pública al poder ser parasitados por estos protozoos. Pero al mismo tiempo, pueden ser utilizados

como indicadores biológicos en las costas (Ghozzi *et al.*, 2017). En este trabajo, se pudo demostrar por primera vez, la presencia de los protozoarios, *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp., por lo cual, se puede sugerir, que el consumo de moluscos bivalvos en Panamá, podría representar un riesgo potencial para la salud de las personas que lo consumen, por ende, deben reforzarse las medidas profilácticas, para disminuir este tipo de riesgos. Estas medidas podrían ser, la educación ambiental, la debida deposición de las excretas humanas y de animales de granja, y el tratamiento de agua residuales cerca de las zonas de producción de estos moluscos bivalvos.

**CAPITULO IV
CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES**

CONCLUSIONES

1. Se determinó la presencia de *Cyclospora* sp., *Giardia* sp. y *Cryptosporidium* sp., en los bivalvos estudiados durante los meses de septiembre a noviembre del 2019.
2. La técnica de montaje directo favorece la detección de *Giardia intestinalis* en comparación con la técnica de concentración por flotación empleada.
3. La especie de molusco bivalvo donde se detectó una mayor frecuencia de *Cryptosporidium* sp. fue *Anadara* sp. ($X^2 = 18.34$, $p < 0.0001$) y el mes de octubre, fue el mes donde se presentó mayor frecuentemente de detección de *Cryptosporidium* sp. en las tres especies de moluscos bivalvos analizados ($X^2 = 10.33$, $p = 0.0013$).
4. El mes de octubre ($X^2 = 4.24$, $p = 0.00394$) también, fue el mes que presentó mayor positividad parasitaria en las tres especies de moluscos bivalvos analizados (*Anadara* sp., *Leukoma* sp. y *Donax* sp.).
5. Se pudo determinar mediante la tinción de Zielh Neelsen, que *Cyclospora* sp. solo se observó en las especies de *Anadara* sp. y *Leukoma* sp. ($X^2 = 0.54$, $p = 0.461$).

RECOMENDACIONES

1. Invertir en más estudios de este tipo.
2. Estudiar más a fondo, conociendo los parámetros y condiciones en las que se encuentran los bivalvos.
3. Hacer docencia respecto a las afectaciones que pueden causar el consumo de moluscos bivalvos.
4. Aplicación de regulaciones y consideración de parámetros microbiológicos y parasitarios, con el fin de garantizar su calidad sanitaria.
5. Considerar los riesgos ambientales que implica la urbanización cerca de las costas, sin un plan adecuado de aguas residuales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, R. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447–475. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447>
- Aksoy, U., Marangi, M., Papini, R., Ozkoc, S., Delibas, S. B., y Giangaspero, A. (2014). Detection of *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayentanensis* in *Mytilus galloprovincialis* from Izmir Province coast (Turkey) by Real Time PCR/High-Resolution Melting analysis (HRM). *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.012>
- Alcaraz S., M. J. (1995). *Giardia Y GIARDIOSIS*. 1–9.
- Álvarez, A. R. (2006). Los protozoos. Características generales y su rol como agentes patógenos. *Ciencia Veterinaria*, 8(1), 62–71.
- Anónimo. (2011). *Ciencia Microbiologica*. <http://cienciamicrobiologica.blogspot.com/2011/12/parasitologia-general-unidad-i.html>
- ARAP. (2012). *Guía básica para el cultivo de moluscos, bivalvos del Pacífico panameño: conchuela, ostras y concha negra.: Vol. (5)2 (Issue 2)*.
- Arvayo, G. (2016). Prevalencia de *cryptosporidium parvum* y otros parásitos intestinales y su asociación a factores de riesgo en escolares rurales y suburbanos del municipio de Hermosillo, Sonora. *Centro de Investigación En Alimentación y Desarrollo, A. C.*

- Ash, L. R., y Orihel, T. C. (2010). *Atlas de Parasitología Humana* (5°). Editorial Médica Panamericana S.A.
- Boulter-bitzer, J. I., Lee, H., y Trevors, J. T. (2007). *Molecular targets for detection and immunotherapy in Cryptosporidium parvum*. 25, 13–44. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.08.003>
- Camacho, H. H., Damborenea, S., y Del Río, C. J. (2008). Bivalvia. In *Los invertebrados Fósiles: Vol. I* (Issue January).
- Campos Machado, S. (2007). *Determinación de bacterias coliformes fecales en ejemplares de Protothaca asperrima en cuatro ecosistemas estuarinos de la zona oriental de El Salvador*.
- Canadian Food Inspection Agency. (2011). *Canadian Shellfish Sanitation Program: Manual of Operations*. 1–139.
- Castro, A., y Guerrero Bermudez, O. (2004). *Técnicas de diagnóstico parasitológico* (S. J. Editorial de la Universidad de Costa Rica, Ed.).
- CDC. (2016). *Centers for Disease Control Prevention - US Department of health y Human Services*. <http://www.cdc.gov/parasites/about.html>.
- CDC. (2020). *Giardiasis*. <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>
- Chacín-Bonilla, L., y Barrios, F. (2011). Cyclospora cayetanensis: Biología, distribución ambiental y transferencia. *Biomedica*, 31(1), 132–144. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i1.344>

- Cieloszyk, J. M. (2016). *Joanna Magdalena Cieloszyk Caracterización molecular de especies, genotipos y subtipos de cryptosporidium spp. aislados en humanos en España e identificación de giardia duodenalis por técnicas moleculares.* 10.
- Criollo, L., y Flores, S. (2015). *DETERMINACIÓN DE Cryptosporidium parvum EN TERNEROS DE LA PARROQUIA EL VALLE DEL CANTÓN CUENCA.* 45.
- Cubilla Ríos, L. (2016). Animales marinos de Pixvae. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Darrigran, G. (2013). *Los moluscos bivalvos . Aportes para su enseñanza : teoría-métodos.*
- Del Coco, V. F., Cordoba, M. A., y Basualdo, J. A. (2009). Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Revista Argentina de Microbiología.*
- Díaz, S., Cabrera, L., García, Y., y Estéves, J. (2017). *Parásitos protozoarios en la almeja Polymesoda solida (Bivalvia: Corbiculidae) presente en el Lago de Maracaibo, Venezuela.*
- Fayer, R., Graczyk, T. K., Lewis, E. J., Trout, J. M., y Parley, C. A. (1998). Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), 1070–1074.
<https://doi.org/10.1128/aem.64.3.1070-1074.1998>

- Fayer, R., Dubey, J. P., y Lindsay, D. S. (2004). Zoonotic protozoa: From land to sea. *Trends in Parasitology*, 20(11), 531–536.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.008>
- García, A., Moreno, R., Outerelo, E., Aguirre, J., Almodóvar, A., Alonso, J., Benito, J., Arillo, A., Berzosa, J., y Buencuerpo, V. (2011). Prácticas de Zoología Estudio y diversidad de los moluscos. Disección de mejillón. *Ser. Zoo*, 4 (2)(2), 61–74.
- García D., P., y Rivera F., N. (2017). Coccidios Intestinales Y Su Aplicación Clínica. *Revista de La Facultad de Medicina de La UNAM*, 60(6), 40–46.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2017/un176f.pdf>
- García, I., Benito, M., Araújo, M., Aguirre, A., Polo, I., Ana, R., Moreno, G., y Refoyo, P. (2008). *Coccidios intestinales y tisulares*. 1(1), 38–48.
- García, P., y Rivera, N. (2017). Coccidios intestinales y su aplicación clínica. *Rev. Fac. Med. (Méx.)*, vol.60, 40–46.
- García-Meseguer, A. J., Esteve, M. A., Robledano, F., y Miñano, J. (2017). *Atlas y Libro Rojo de los Moluscos Continentales de la Región de Murcia*. November, 338.
- Garza, V., y Morales, M. (n.d.). *AGUA Y SALUD: Cryptosporidium parvum , AGENTE CAUSAL DE UNA NUEVA ENFERMEDAD RELACIONADA CON EL AGUA * Introducción*.

- Getchell, R.G, Devel., Gosling, E., Grizel, H., Miahle, E., Chagot, D., y Jorgensen, C. B. (2016). Biología básica de los bivalvos: taxonomía , anatomía y ciclo vital. *Cultivos de Bivalvos En Criadero. Manual Práctico.*, 3, 19–30.
- Ghozzi, K., Marangi, M., Papini, R., Lahmar, I., Challouf, R., Houas, N., ben Dhiab, R., Normanno, G., Babba, H., y Giangaspero, A. (2017). First report of Tunisian coastal water contamination by protozoan parasites using mollusk bivalves as biological indicators. *Marine Pollution Bulletin*, 117(1–2), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.057>
- Gómez Couso, H. (2005). *Cryptosporidium en moluscos bivalvos*. 183.
- Gómez, G., Yau, I., Guevara, I., Cornejo, H., Mejía, F., y Martínez, O. (2016). *Calidad microbiológica de las zonas de producción de los bivalvos Anadara grandis, Protatha asperrima y Anadara tuberculosa en Panamá*. Universidad de Panamá.
- González, M. I., Rojas, T. T., y Chiroles Rubalcaba, S. (2003). Microbiological quality of coastal waters in tropical climates. *Cub@: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista Electrónica de La Agencia de Medio Ambiente*, 3(4).
- González, L., y Suárez, M. (1991). *Epidemiological Considerations on Cryptosporidiosis*. 4, 363–370.
- Hamza-Chaffai, A. (2014). Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3(1), 19–26. <https://doi.org/10.6000/1927-3037.2014.03.01.4>

- Herwaldt, B. L. (2000). Cyclospora cayetanensis: A review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990s. *Clinical Infectious Diseases*, 31(4), 1040–1057. <https://doi.org/10.1086/314051>
- Innes, E. A., Chalmers, R. M., Wells, B., y Pawlowic, M. C. (2020). A One Health Approach to Tackle Cryptosporidiosis. *Trends in Parasitology*, 36(3), 290–303. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.016>
- Jacomé, C. (2007). *Capítulo 20 Moluscos* (pp. 12–20).
- Johnson, D. C., Reynolds, K. A., Gerba, C. P., Pepper, I. L., y Rose, J. B. (1995). Detection of Giardia and Cryptosporidium in marine waters. *Water Science and Technology*, 31(5–6), 439–442. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00308-A](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00308-A)
- Jordán, L., y Gómez, J. (2006). Evaluación Biológica de Anadara tuberculosa, Golfo de Montijo, República de Panamá. *Tecnociencia*, 8(2), 191–205.
- Li, X., Guyot, K., Dei-cas, E., Mallard, J., Jacques, J., y Brasseur, P. (2006). *Cryptosporidium oocysts in mussels (Mytilus edulis) from Normandy*. 108, 321–325. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.018>
- López, I., Luna, I. G., Gutiérrez, A., y Villalaz, J. (2003). Relación Del Desarrollo Gonadal De La Almeja Blanca (Protothaca Asperrima) (Pelecypoda: Veneridae) Con La Tasa De Consumo De Oxigen. *Tecnociencia*, 5, 87–96.
- López, I., Luna, I. G., Gutiérrez, A., y Villalaz, J. (2005). Ciclo Reproductivo De La Almeja Blanca Protothaca Asperrima (Pelecypoda: Veneridae) En Playa Bique, Arraijan. *Tecnociencia*, 7(1), 43–53.

- Machado Lemus, S. R. (2014). Prevalencia de Giardiasis en perros de la Ciudad de Guatemala [Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Escuela de Medicina Veterinaria]. In *Vetzoo.Umich.Mx*. <https://doi.org/ro>
- Martinez, E. (2018). *Relacion del genero Cryptosporidium con la subclase Gregarina del filo Apicomplexa*.
- Maseda, A. N. (2005). *Estudio de la respuesta inmune en hemocitos en Mytilus galloprovincialis*. 198.
- Molina, N. B. (2009). Epidemiología molecular de Giardia lamblia en comunidades urbanas y rurales de Buenos Aires y Mendoza, Argentina. *Tesis de Maestria*.
- Neves, D. P. (2004). *Parasitología Humana* (Atheneu, Ed.).
- Ortega, Y. R., y Sanchez, R. (2010). Update on Cyclospora cayetanensis, a food-borne and waterborne parasite. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 218–234. <https://doi.org/10.1128/CMR.00026-09>
- Paredes, C., y Cardoso, F. (2001). El género donax en la costa peruana (bivalvia: Tellinoidea). *Revista Peruana de Biología*, 8(2), 83–93. <https://doi.org/10.15381/rpb.v8i2.8363>
- Piedrasanta E., E. Y. (2003). *Determinacion de la influencia de dos detergentes en la recuperacion de ooquistes de Cyclospora cayetanensis de vegetales y frutas contaminadas experimentalmente en el laboratorio*.

- Pokorny, N. J., Weir, S. C., Carreno, R. A., y Trevors, J. T. (2002). *Influence of Temperature on Cryptosporidium parvum Oocyst Infectivity in River Water Samples as Detected by Tissue Culture Assay*. 88(3), 641–643.
- Posada, J. M., Piedra, A., Ross, E., Días, J. M., Melo, G., Sánchez, N., Guerra, Z., y De León, M. (2014). *Guía de Identificación: Invertebrados marinos de importancia comercial en la costa Pacífica de Panamá*. 120.
- Recio, G. (2016). *Bivalvos, características y clasificación*.
<https://invertebrados.paradise-sphinx.com/moluscos/bivalvos-caracteristicas-clasificacion.htm#habitat-de-los-bivalvos>
- Reséndiz N., C. N. (2017). *Desarrollo de ensayos moleculares para la detección, cuantificación y caracterización genética de Cyclospora cayetanensis en frutillas y hortalizas*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Rivera, N., Torrejon, E., y Madrid, M. (1997). Primer hallazgo de Cyclospora cayetanensis en Concepción, Chile 1997. *Parasitología al Día*, 21, 3–4.
- Robertson, L. J. (2007). The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 120(3), 201–216.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.058>
- Robertson, L. J., Campbell, A. T., y Smith, H. V. (1992). *Survival of Cryptosporidium parvum Oocysts under Various Environmental Pressures*. 58(11), 3494–3500.

- Rodríguez, J. C., y Royo, G. (2001). *Cryptosporidium* y criptosporidiosis. *Control Calidad SEIMC*, 1–7.
- Rodríguez, S. R. (2009). *Diagnóstico del cultivo y extracción de moluscos en Centroamérica*.
- Rodríguez U., C. C. (2012). *Prevalencia de infección por Giardia lamblia y algunos factores de riesgo asociados en preescolares y escolares del distrito de los Baños del Inca-Cajamarca*. 124.
- Ryan, U., y Cacciò, S. M. (2013). Zoonotic potential of Giardia. *International Journal for Parasitology*, 43.
- Sánchez O., C. A. (2017). *Detección y caracterización molecular de los parásitos de interés en salud pública: Giardia duodenalis, Cryptosporidium spp., Cyclospora cayetanensis, Toxoplasma gondii y Entamoeba histolytica, en agua cruda y tratada de cuatro plantas potabilizadoras del*. Universidad Nacional de Colombia.
- Sanhueza, G., y Cachicas, V. (2020). *Detección y cuantificación de virus de hepatitis A en moluscos en las bahías de Concepción y Arauco , Chile* . 3(1).
- Sibley, L. D. (2004). Intracellular Parasite Invasion Strategies. *Science*, 304(5668), 248–253. <https://doi.org/10.1126/science.1094717>
- Simmons, B. (2008). *Contribución a la prevención de zoonosis parasitarias derivadas de la introducción y cría de avestruces y otras ratites en España*. 1–292.

- Suarez, P. (Universidad de C., Yanez, M. J. (Universidad de C., Fernandez, I., y Veronica, M. (2020). Detección de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa Cryptosporidiidae) en ejemplares de cholga *Aulacomya ater* extraídas desde la costa de la Región del Bio Bio, Chile. *Rev Chilena*.
- Vasquez, I., Restrepo, M., y Botero, D. (1986). *Cryptosporidiosis*. Edición 6.
- Walker, D. I., Younger, A., Stockley, L., y Baker-Austin, C. (2018). *Escherichia coli* testing and enumeration in live bivalve shellfish – Present methods and future directions. *Food Microbiology*, 73, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.12.006>
- Yaoyu, F., y Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 110–140. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-10>

ANEXOS

Tabla 1. Mecanismos patogénicos de los coccidios en la relación huésped- parásito (García D. y Rivera F., 2017).

Desenquistamiento	Liberación de esporozoitos .	Proteínas y proteasa que lesionan el epitelio intestinal.	Ruptura de uniones celulares, aumenta el índice mitótico de enterocitos.	Diarrea osmorica de gran volumen aguda o crónica.
Invasión	Los esporozoitos se adhieren a los enterocitos y los invaden haciendo una horadación en la membrana celular.	Activación de células inflamatorias y producción de citocinas proinflamatorias.	Atrofia de vellosidades intestinales.	Deshidratación, síndrome de mala absorción, pérdida de peso y retardo en el crecimiento.
Esquizogonia	Replicación asexual (se forman trofozoitos, esquizontes y merozoitos)	Los linfocitos CD4+ intraepiteliales y al IgA, parecen jugar un rol importante en el control de estas parasitosis.	Estas lesiones aumentan la permeabilidad intestinal y la secreción Cytosisopora produce infiltrado eosinofílico en lámina propia.	Complicaciones: invasión del epitelio respiratorio, vías biliares y pancreáticas, síndrome de Guillain-Barré, artritis reactiva.
Gametogonia	Formación de macro y microgametos.			
Fertilización	Unión de microgametocito y macrogametocito.			
Formación de ooquiste	Fase de resistencia-			
Esporogonia	Formación de esporozoitos infectantes.			

Tabla 2. Especies de *Cryptosporidium* sp. Fuente: Cryptosporidiosis: una zoonosis emergente (Del Coco *et al.*, 2009).

Especie	Hospedador	Localización primaria en el hospedador
<i>C. muris</i>	<i>Mus musculus</i>	Gástrica
<i>C. parvum</i>	<i>Mus musculus</i>	Intestinal
<i>C. wrairi</i>	<i>Cavia porcellus</i>	Intestinal
<i>C. felis</i>	<i>Felis catis</i>	Intestinal
<i>C. andersoni</i>	<i>Bos Taurus</i>	Gástrica
<i>C. canis</i>	<i>Canis familiaris</i>	Intestinal
<i>C. hominis</i>	<i>Homo sapiens</i>	Intestinal
<i>C. suis</i>	<i>Sus scrofa</i>	Intestinal
<i>C. bovis</i>	<i>Bos Taurus</i>	Desconocida
<i>C. fayeri</i>	<i>Macropus giganteus</i>	Desconocida
<i>C. ryanae</i>	<i>Bos taurus</i>	Desconocida
<i>C. macropodum</i>	<i>Macropus giganteus</i>	Desconocida
<i>C. molnari</i>	<i>Spauris auratus</i> <i>Dicentrarchus labrax</i>	Gástrica
<i>C. scophthalmi</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	Intestinal
<i>C. serpentis</i>	<i>Elaphe guttata</i>	Gástrica
<i>C. waranii</i>	<i>Varanus prasinus</i>	Gástrica
<i>C. fragile</i>	<i>Duttaphynus melanostictus</i>	Gástrica

Tabla 3. Resultados obtenidos durante septiembre, octubre y noviembre en 3 diferentes zonas de muestreo pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste (*Anadara* sp.), Bique, Arraijan, Panamá Oeste (*Leukoma* sp.), Playa Chinina, Chepo (*Donax* sp.)

		Montaje Directo			Flotación			Tinción de Zielh Neelsen	Tinción de Koster	Tinción de Giemsa	
Bivalvo		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Cyclospora</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Cyclospora</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Cyclospora</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
Septiembre	<i>Anadara sp</i>	3	1	2	2	1	0	4	1	1	0
	<i>Leukoma sp</i>	3	2	2	2	1	1	4	3	1	0
	<i>Donax sp</i>	3	1	0	3	2	0	3	0	1	0
Octubre	<i>Anadara sp</i>	3	1	1	1	0	0	5	1	1	1
	<i>Leukoma sp</i>	2	1	0	4	1	0	5	2	1	0
	<i>Donax sp</i>	3	2	0	3	1	0	4	4	3	0
Noviembre	<i>Anadara sp</i>	4	5	4	4	3	0	5	1	1	1
	<i>Leukoma sp</i>	3	1	0	3	1	0	1	0	1	0
	<i>Donax sp</i>	1	2	2	2	2	0	2	0	2	0

Tabla 4. Peso y talla de los ejemplares de bivalvos, considerando su peso completo y peso de la concha sola. Además, el tamaño del bivalvo de mayor tamaño y el de menor tamaño

Bivalvo	M1 (uds)	M2 (uds)	M3 (uds)	M4 (uds)	M5 (uds)	Peso completo		Peso de concha		Tamaño			
						Grande (g)		Pequeña (g)		Grande		Pequeña	
						Ancho (mm)	Alto (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)				
Septiembre													
<i>Anadara spp</i>	5	5	7	5	6	143.5 g	48.0	48.7	11.3	73.48	54.33	42.54	36.78
<i>Leukoma spp</i>	25	27	19	24	23	26.0	5.0	16.0	2.0	44.47	38.33	22.35	22.05
<i>Donax spp</i>	103	97	102	107	93	10.0	2.0	6.8	1.3	35.32	23.07	21.13	13.39
Octubre													
<i>Anadara spp</i>	8	9	9.5	9	9.5	57.0	38.0	36.0	20.0	54.9	41.08	44.5	33.58
<i>Leukoma spp</i>	41	44	38	35	48	20.0	3.0	14.0	2.0	36.01	32.95	21.84	18.74
<i>Donax spp</i>	95	98	108	96	99	8.0	5.0	5.4	1.0	30.96	21.25	21.75	14.94
Noviembre													
<i>Anadara spp</i>	12	12	12	11	13	34.1	14.9	23.0	8.0	47.79	36.81	35.86	27.21
<i>Leukoma spp</i>	39	42	41	49	55	27.0	4.0	13.0	2.2	38.71	33.39	19.58	17.89
<i>Donax spp</i>	100	107	112	104	110	7.5	4.2	4.7	1.7	28.68	20.23	21.20	13.68

Tabla 5. Metodología de obtención y procesamiento de muestras

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Septiembre	<i>Anadara</i> spp. Playa de Chame	<i>Leukoma</i> spp. Playa de Bique	<i>Donax</i> spp. Chinina, Chepo	Planeación para el siguiente procesamiento
Octubre	<i>Anadara</i> spp. Playa de Chame	<i>Leukoma</i> spp. Playa de Bique	<i>Donax</i> spp. Chinina, Chepo	
Noviembre	<i>Anadara</i> spp. Playa de Chame	<i>Leukoma</i> spp. Playa de Bique	<i>Donax</i> spp. Chinina, Chepo	

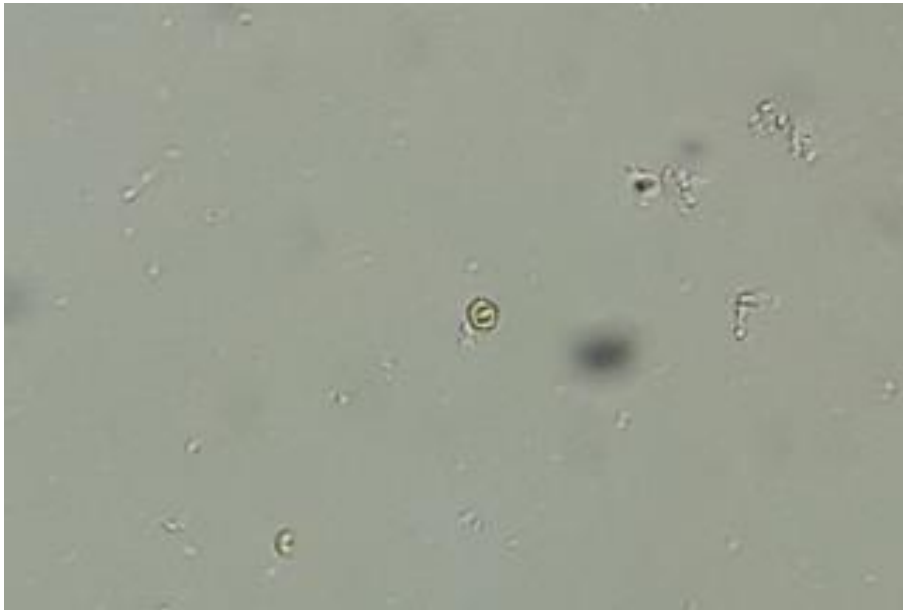


Figura 18. *Cryptosporidium* sp. - mediante montaje directo.

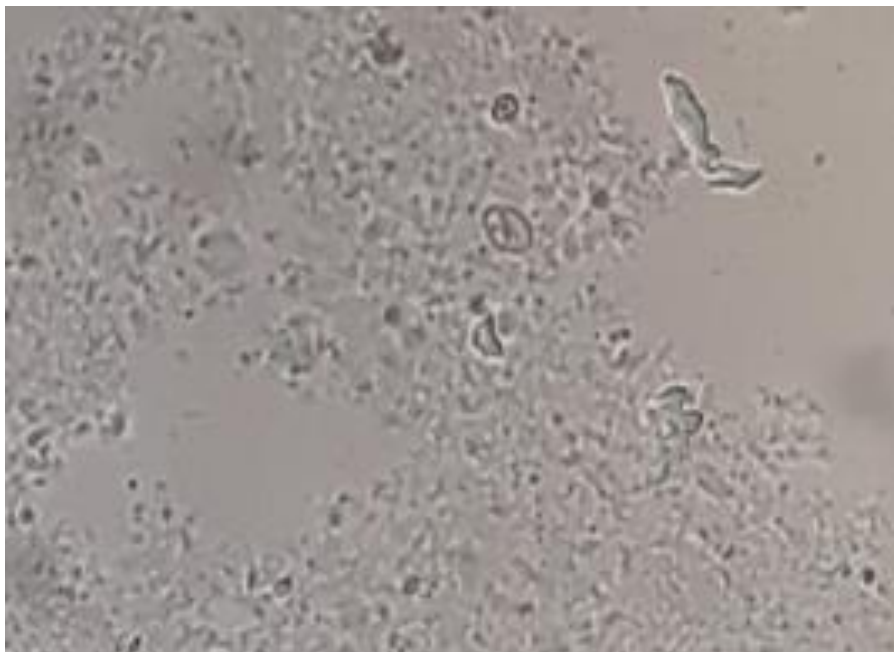


Figura 19. *Giardia intestinalis* – mediante montaje directo.

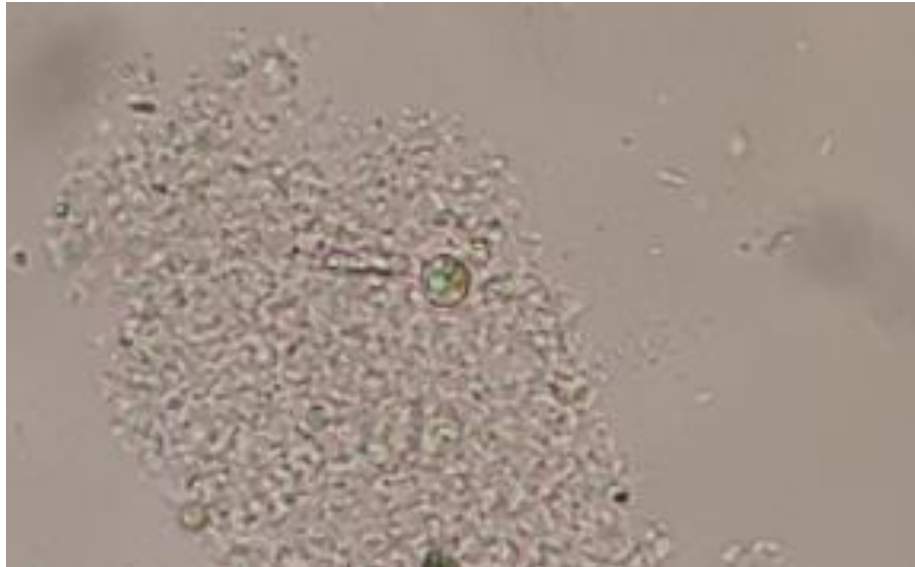


Figura 20. *Cyclospora* sp. – mediante montaje directo.

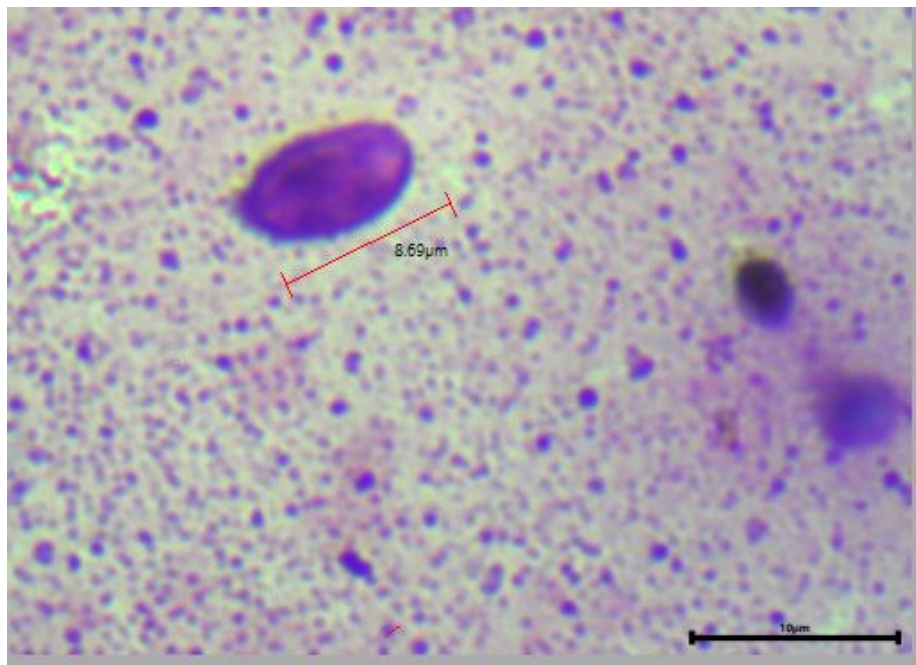


Figura 21. *Giardia intestinalis* – Tinción de Giemsa.

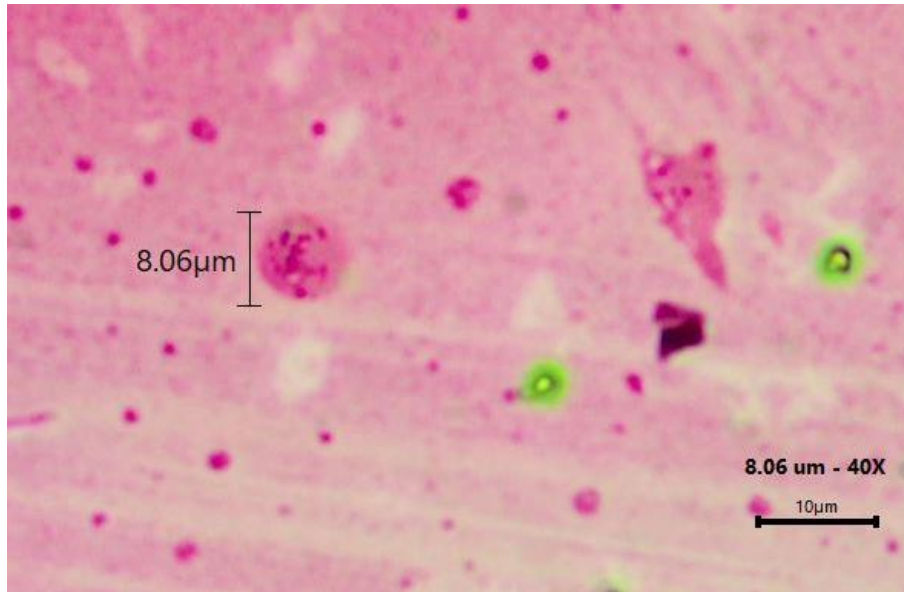


Figura 22. *Cyclospora* sp. – Tinción de Zielh Neelsen.

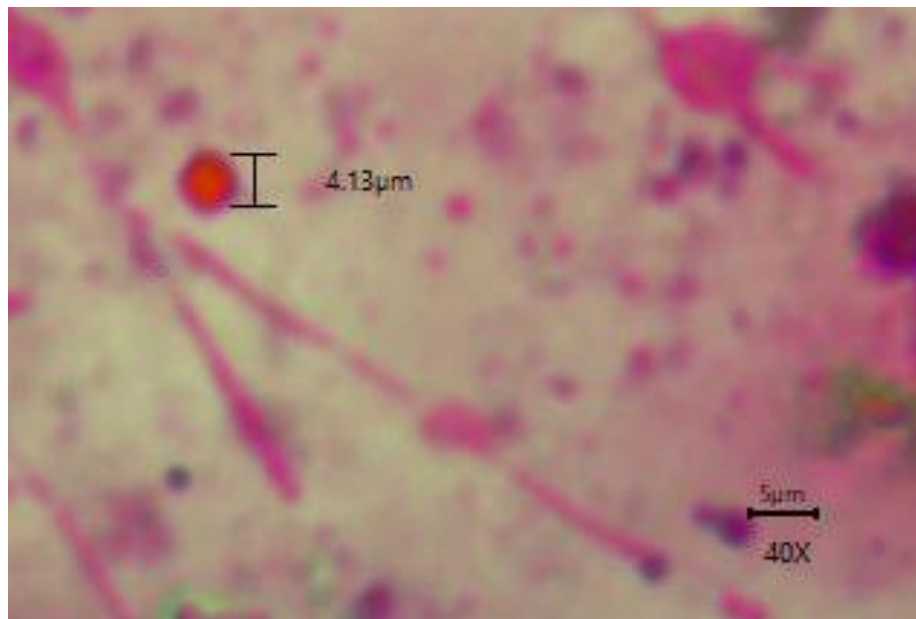


Figura 23. *Cryptosporidium* sp. - Tinción de Zielh Neelsen.

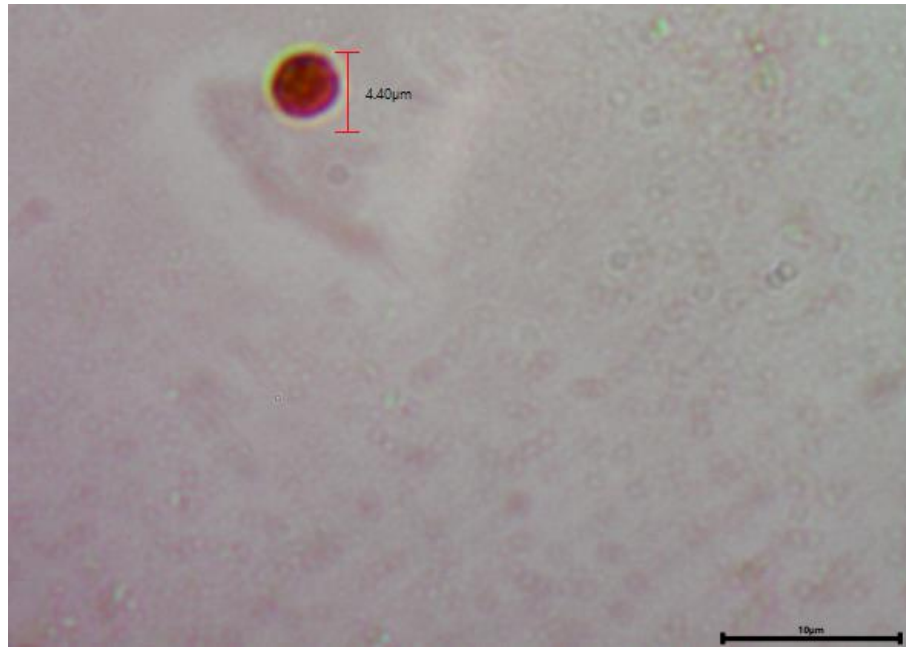


Figura 24. *Cryptosporidium* sp. - Tinción de Koster.



Figura 25. *Leukoma* sp. – recolectada en el mes de noviembre.



Figura 26. Medición de los ejemplares de *Leukoma* sp. (A y B) – recolectada en el mes de noviembre.



Figura 27. *Anadara* sp. – recolectada en el mes de octubre.



A.



B.

Figura 28. Medición de los ejemplares de *Anadara* sp. – recolectada en el mes de octubre.



Figura 29. *Donax* sp. – recolectada en el mes de septiembre.

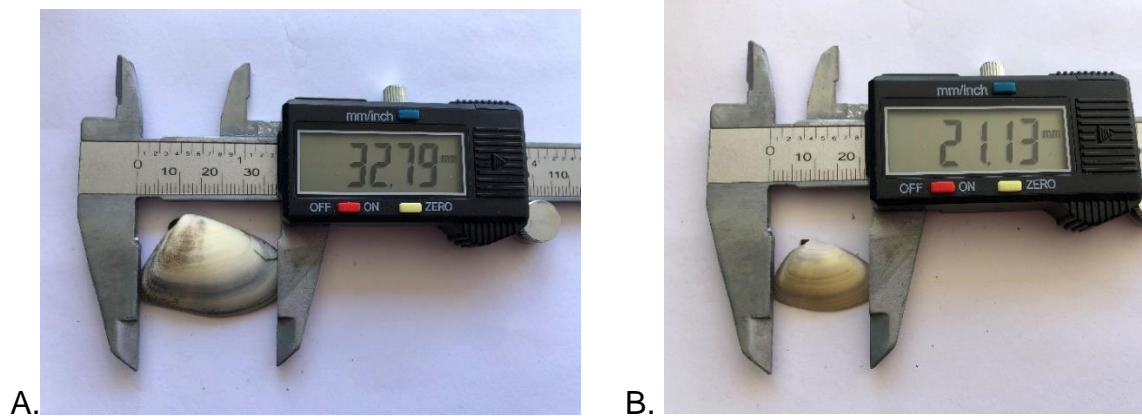


Figura 30. Medición de los ejemplares de *Donax* sp. – recolectada en el mes de septiembre.

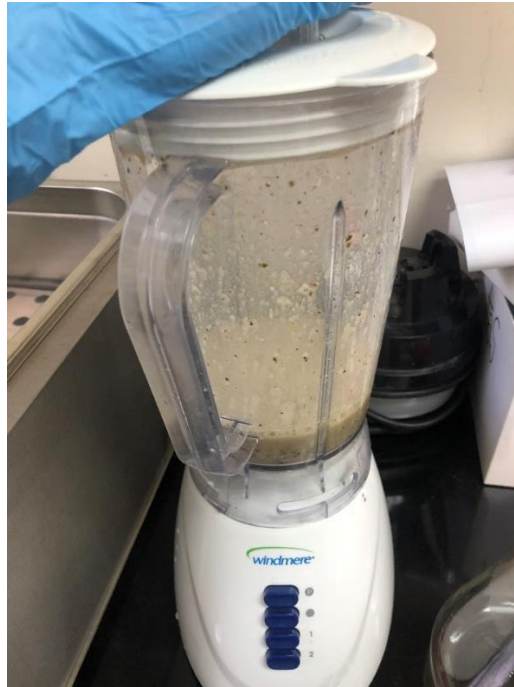


Figura 31. Procesamiento de la muestra, homogenización del cuerpo con el líquido intervalvar más Buffer Fosfato



Figura 32. Porción por cada 100 g de muestra homogenizada, que dio 5 submuestras a la cual se le agregó Buffer Fosfato-Peptona y luego, se pasó por el vortex.



Figura 33. Limpieza de la muestra con Acetato de Etilo.



Figura 34. Realización de las tinciones.

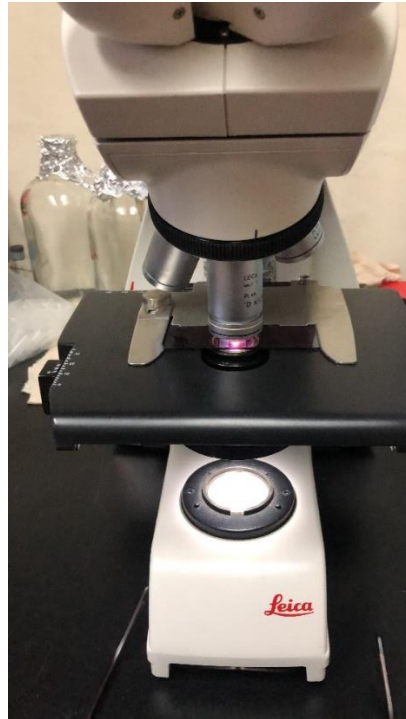


Figura 35. Observación de las muestras al microscopio.