

Prevalencia de *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidios y determinación de coliformes fecales en frutas y vegetales frescos de consumo crudo en Costa Rica

Melvin Calvo, Melissa Carazo, María Laura Arias, Carolina Chaves, Rafael Monge y Misael Chinchilla

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Instituto Costarricense de Investigación
y Enseñanza en Nutrición y Salud

RESUMEN. La presencia de *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidios y los niveles de coliformes fecales fueron determinados en lechuga, apio, cilantro, fresas y moras adquiridas en ferias del Agricultor del Valle Central de Costa Rica, con el fin de establecer el riesgo de transmisión de estos microorganismos y otros patógenos a partir del consumo de productos crudos. Durante el Segundo semestre del 2001 y primero del 2002, 50 muestras de cada producto fueron evaluadas, 25 durante la estación seca y 25 durante la estación lluviosa y provenientes de cinco diferentes ferias del Agricultor. El recuento de coliformes fecales fue realizado de acuerdo a la técnica recomendada por Vanderzant & Splittstoesser. La determinación de parásitos fue hecha utilizando las tinciones de Ziehl Nielsen y Weber a partir de un sedimento obtenido por el lavado de los productos mencionados, usando agua peptonada estéril 0,1% y centrifugando a 900 G por 15 min. 100% de las muestras de vegetales presentaron coliformes fecales, y la mayor prevalencia fue obtenida durante la estación lluviosa. A pesar de que todos los vegetales presentaron coliformes fecales en altas concentraciones, la lechuga y cilantro presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la estación lluviosa y la seca, siendo mayor durante la estación lluviosa. No se detectó coliformes fecales en fresas y moras probablemente debido a su bajo pH. Todos los productos evaluados presentaron, aunque sea una vez, *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp. y microsporidios, demostrando el riesgo que representan para la Salud Pública. *Cryptosporidium* sp. estuvo presente en todos los productos excepto fresas. Los microsporidios fueron aislados de todos los productos excepto moras y *Cyclospora* sp. únicamente fue aislado de lechuga durante la estación seca. Los resultados demuestran la importancia de introducir en el país las Buenas Prácticas Agrícolas, especialmente debido a la resistencia de *Cyclospora* sp. y *Cryptosporidium* sp. a agentes desinfectantes.

Palabras clave: *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidios, coliformes fecales, vegetales, frutas.

SUMMARY. Prevalence of *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidia and fecal coliform determination in fresh fruit and vegetables consumed in Costa Rica. The presence of *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp. and microsporidia and the levels of fecal coliforms were determined in lettuce, parsley, cilantro, strawberries and blackberries acquired in local agricultural markets of the Central Valley of Costa Rica, in order to establish the possible transmission risk of these microorganisms and other pathogens from the consumption of these raw products. During the second semester of 2001 and the first of 2002, 50 different samples of each product, 25 taken in the dry season and 25 in the rainy season and coming from five different local agricultural markets were evaluated. The fecal coliforms count was done according to the technique recommended by Vanderzant & Splittstoesser. The parasite determination was done using Ziehl Nielsen and Weber staining techniques from a sediment obtained through the rinse of the mentioned products, using sterile peptonated water 0,1% and centrifuging at 900 G for 15 min. One hundred per cent of vegetable samples had fecal coliforms and the greatest prevalence was obtained during the rainy season. Although all vegetables presented fecal coliforms in high concentrations, lettuce and cilantro presented statistical difference between rainy and dry season, being greater during the rainy season. Fecal coliforms were not detected in strawberries and blackberries probably due to its low pH. All products evaluated presented, at least once, *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora* sp. and microsporidia, showing the risk they represent to Public Health. *Cryptosporidium* was present in all products but strawberries. Microsporidia was present in all products except blackberries and *Cyclospora* was only isolated from lettuce during the dry season. These results show the importance of introducing in the country Good Agricultural Practices, especially due to the resistance of *Cryptosporidium* and *Cyclospora* to disinfecting agents.

Key words: *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidia, fecal coliforms, vegetables, fruits.

INTRODUCCION

Actualmente el consumo de frutas y vegetales es promovido como estrategia para reducir el riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer (1). No obstante, debido a las

prácticas seguidas durante su cultivo, cosecha y comercialización, tales alimentos pueden representar un foco de microorganismos patógenos. Bacterias como *Salmonella* sp., *Aeromonas* sp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* y *Bacillus*

cereus, entre otras, han sido frecuentemente aisladas de frutas y vegetales e identificadas como responsables de brotes de gastroenteritis o listeriosis (2). Además virus como Hepatitis A, Norwalk y algunos parásitos como *Lamblia intestinalis* y *Entamoeba histolytica* han sido responsables de diversos cuadros infecciosos vinculados con el consumo de alimentos (2). Recientemente *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium* sp. y los Microsporidios han emergido como importantes patógenos vinculados con alimentos (2).

Desde su descripción en 1986, *Cyclospora cayetanensis*, ha sido ampliamente reconocido como agente causal de diarrea. Los humanos son infectados por la ingestión de ooquistes esporulados y presentan las manifestaciones clínicas en un período que oscila entre 2 a 11 días después de la exposición al microorganismo (3). No obstante, se han reportado períodos de incubación de tan solo 12 a 24 horas (4). A la fecha se desconoce la dosis infectante de este coccidio, sin embargo se presume que ésta debe ser baja (3).

La transmisión de *Cyclospora cayetanensis* por agua ha sido documentada en diversos estudios en los Estados Unidos y Nepal. (4-5). También se ha demostrado la transmisión de este coccidio por alimentos siendo la frambuesa, lechuga y albahaca, los más involucrados como vehículos del microorganismo (3,6). Ningún brote ha sido asociado con alimentos congelados o cocinados.

Se ha observado una marcada estacionalidad de la infección por *Cyclospora cayetanensis* en diferentes países, a pesar de las diferencias climatológicas, lo cual aún está sin explicarse; sin embargo parece estar relacionado en parte a las fluctuaciones en la temperatura y la humedad (3). Una situación similar se ha observado con *Cryptosporidium* sp. pues la mayor incidencia de infección con este parásito también ocurre durante los meses más calientes y húmedos (7).

Cryptosporidium sp. es un coccidio que parasita sobre las células de mucosa gastrointestinal de una gran variedad de vertebrados, incluyendo al hombre. La diarrea acuosa y profusa constituye la principal característica de la criptosporidiosis (8). Se ha sugerido que algunas personas pueden desarrollar la enfermedad después de la ingestión de tan solo un ooquiste (8). Esto explica la elevada tasa de ataque (mayor a 62%) observada en los diferentes brotes (9,10).

Un reciente informe identificó la cidra de manzana como la causa de una epidemia de criptosporidiosis (11). Según algunos autores, esto indica que las manzanas y otras frutas pueden ser potenciales vectores de diarrea (12). Además la elevada prevalencia de *Cryptosporidium* sp. en las aguas de irrigación de vegetales, sugiere fuertemente el papel de estos alimentos en la transmisión del parásito (13). Estudios realizados en Costa Rica han evidenciado una prevalencia del 5% de este coccidio en cilantro, del 2,5% en lechuga y del 1,2% en pepino, rábano y zanahoria (14).

La presencia de *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora cayetanensis* en frutas y vegetales es de considerable importancia para la salud pública, pues el lavado de estos alimentos y la desinfección de los mismos no logra eliminar ninguno de los dos microorganismos (13).

Los microsporidios son otros de los agentes emergentes responsables de brotes de diarrea. El número de microsporidios requerido para causar enfermedad en humanos se desconoce; no obstante, la inoculación de tan solo 100 esporas pueden causar enfermedad letal en individuos de laboratorio con deficiencia de células T (15).

A la fecha, no existe información disponible sobre la transmisión de microsporidios por alimentos. Sin embargo, estos parásitos han sido responsables de brotes de diarrea asociados al consumo de agua. Estos hallazgos han sido básicamente informados en Francia y en los Estados Unidos (15).

Es abundante la evidencia científica que confirma la transmisión por agua de los tres parásitos antes mencionados. Esto es de vital importancia en Costa Rica, pues las aguas de irrigación utilizadas sobrepasan considerablemente los niveles sanitarios sugeridos por la Organización Mundial de la Salud (10³/ 100mL coliformes fecales) (16). Por otro lado, la prevalencia de microsporidios y *Cyclospora cayetanensis* en vegetales frescos y frutas es desconocida, así como se carece de información sobre la prevalencia de *Cryptosporidium* sp. en estos productos. Sin embargo, se ha reportado su aislamiento a partir de aguas superficiales costarricenses (17).

Dado lo anterior, se pretende con este trabajo determinar la prevalencia de *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp., microsporidios y coliformes fecales en frutas y vegetales frescos de consumo frecuente en Costa Rica.

MATERIAL Y METODOS

Localización del proyecto

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología de Alimentos y Aguas y de Protozoología de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica durante un período que comprendió los meses de octubre, noviembre y diciembre del año 2001 (125 muestras); y enero, febrero y marzo del año 2002 (125 muestras).

Selección de los sitios de muestreo

Se utilizaron 5 diferentes Ferias del Agricultor previamente seleccionadas. Estas fueron determinadas por probabilidad proporcional al tamaño entre aquellas que se realizan los sábados en el Valle Central. Las ferias se clasificaron de acuerdo al número de vendedores en las siguientes categorías: 1. pequeñas, menos de 100, medianas, entre 100-200, y grandes, más de 200. Las ferias seleccionadas fueron: Heredia, Tibás, Guadalupe, Naranjo y Desamparados.

Muestras

Se analizaron 25 muestras de cada producto (lechuga, apio, cilantro, fresas y moras) durante la estación lluviosa del 2001 (agosto, setiembre y octubre) y otras 25 muestras durante la estación seca del 2002 (enero, febrero y marzo). Durante cada período de estudio se tomó, por feria, una muestra de 5 unidades de cada producto, una por puesto de venta.

Análisis microbiológico

Las muestras se procesaron por la técnica de lavado (18), con 225 mL de agua peptonada al 0.1% siguiendo la técnica de recuento en placa para coliformes fecales recomendada por Vanderzant y Splittstoesser (18).

El líquido restante del enjuague se centrifugó a 900G por 15 minutos. El sedimento se utilizó para la determinación de los parásitos de interés. El diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. se efectuó empleando la técnica de Koster modificada (19) y la determinación de *Cyclospora cayetanensis* se llevó a cabo mediante la tinción de Ziehl-Nielsen modificada (20). Para la identificación de microsporidios se realizó con la técnica de Weber (21).

RESULTADOS Y DISCUSION

Las enfermedades de origen alimentario han sido reconocidas a nivel mundial como de alta prioridad debido al elevado potencial que los alimentos poseen en la emergencia o reemergencia de amenazas microbiológicas para la salud (22). Se estima que las enfermedades de origen alimentario causan por año 76 millones de enfermos, 325.000 hospitalizaciones y 5.000 mil muertes sólo en los Estados Unidos (23).

Los resultados microbiológicos obtenidos a partir del análisis de 250 muestras de hortalizas y frutas de consumo crudo en nuestro país reflejan que el 100% de las muestras de hortalizas presentaron coliformes fecales en concentraciones superiores a 10^4 UFC/g, mientras que las frutas resultaron negativas para este parámetro (<10 UFC/g). Es importante considerar que los valores obtenidos en hortalizas no incluye la carga de coliformes fecales obtenidos en su raíz, ya que esta parte del producto fue eliminada antes de procesar las muestras.

La concentración promedio de coliformes fecales en hortalizas fue mayor durante la estación lluviosa que en la estación seca (Tabla 1). Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para la lechuga y cilantro, al comparar la carga de coliformes fecales durante la estación lluviosa y la seca. Este dato es divergente a resultados de un estudio anterior hecho en Costa Rica donde se determinó una mayor contaminación fecal en la estación seca (14). No obstante, esta diferencia resalta no sólo que en nuestro país la calidad sanitaria de las aguas utilizadas para la irrigación es inaceptable

(24), sino también la influencia de muchos factores adicionales, incluyendo cultivo, transporte, manejo, almacenaje y prácticas agrícolas que acarrearán contaminación a los productos. La importancia del incremento en la carga bacteriológica por factores ajenos a la producción y la irrigación, también ha sido demostrada por otros estudios, en los que se ha determinado mayores niveles de coliformes fecales en los productos que se encuentran en venta comparado con los que se analizaron directamente de las áreas de cultivo, demostrado así la importancia de la contaminación postcultivo (23).

TABLA 1

Promedio de coliformes fecales/gramo en hortalizas y frutas de las Ferias del Agricultor del Valle Central durante la estación lluviosa 2001 y seca 2002.

Producto	Promedio UFC/g	
	Estación Lluviosa (n= 25)	Estación Seca (n= 25)
Lechuga	$7,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
Apio	$3,4 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$
Cilantro	$6,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
Fresas	<10	<10
Moras	<10	<10

Por otro lado, se debe destacar que para las fresas y moras, no se obtuvo ningún crecimiento de coliformes fecales, ni siquiera a partir de la solución inicial de lavado de las muestras. Esta ausencia de coliformes fecales pone de manifiesto la protección natural que estos productos poseen debido probablemente al bajo pH que presentan, siendo este de aproximadamente 3,86 para fresas y 2,86 para las moras, en contraste con los valores cercanos a pH neutro obtenido para la lechuga, culantro y apio en los cuales se favorecen el crecimiento bacteriano como se ha podido observar.

En cuanto a la prevalencia de *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora cayetanensis* y microsporidios en hortalizas y frutas, los resultados obtenidos evidencian el riesgo que existe, ya que en todos los productos se encontró al menos uno de estos microorganismos (Tabla 2).

Los microsporidios fueron aislados de todos los productos analizados excepto las moras. La lechuga fue el producto que presentó mayor porcentaje de positividad (32%), seguida por el cilantro (4%) y el apio y las fresas (2%). Estos resultados ponen de manifiesto la alta probabilidad de contaminación con este parásito en productos de consumo crudo. A pesar de que el número de microsporidios requerido para causar enfermedad en humanos se desconoce, se ha comprobado que la inoculación de sólo 100 esporas puede causar enfermedad letal en individuos con deficiencia de linfocitos T (15).

TABLA 2
Prevalencia de Microsporidios, *Cryptosporidium* y *Cyclospora cayetanensis* sp. en hortalizas y frutas de las Ferias del Agricultor del Valle Central durante la estación lluviosa 2001 y seca 2002

Hortaliza/ Fruta	Microsporidios		<i>Cryptosporidium</i> sp.		<i>Cyclospora</i> <i>cayetanensis</i>	
	Seca (n= 25)	Lluviosa (n= 25)	Seca (n= 25)	Lluviosa (n= 25)	Seca (n= 25)	Lluviosa (n= 25)
Lechuga	32 %	32 %	24%	4%	0%	8%
Apio	0 %	0 %	4%	0%	0%	0%
Cilantro	4 %	4 %	4%	0%	0%	0%
Fresas	0 %	4,3 %	0%	0%	0%	0%
Moras	0 %	0%	8%	4%	0%	0%

También, se debe considerar que las esporas de microsporidios son resistentes a condiciones ambientales y pueden permanecer infecciosas por muchos años, particularmente si se encuentran protegidas de la desecación (26), lo cual podría explicar la alta prevalencia en las lechugas las cuales pueden ofrecer un microambiente más húmedo entre sus grandes hojas.

Cryptosporidium sp. también fue aislado en todos los productos excepto en las fresas. La lechuga presentó el mayor porcentaje de positividad (24%) y se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la estación lluviosa (24%) y la seca (4%) ($\alpha < 0,05$).

Los resultados de prevalencia obtenidos para este parásito, muestran una variación importante al compararlos con los que se obtuvieron en un estudio similar realizado hace casi diez años en el país, en los que la prevalencia de criptosporidios encontrada para hojas de cilantro y lechuga fue de 5% y 2,5% respectivamente (14), mientras que los encontrados en este nuevo estudio (Cuadro 2), muestran una disminución de un 3% en las hojas de cilantro, así como un considerable aumento de 11,5% en lechuga. También, dada la baja dosis infectante necesaria para causar infección observada en algunas personas, en los cuales un solo ooquiste es capaz de producir enfermedad (8), debe considerarse importante la prevalencia de 4% encontrada en las moras, y de 2% en apio y cilantro.

Es importante recalcar el papel que el agua ha tenido como fuente de contaminación y transmisión de este parásito, así como considerar el papel que juegan las heces de los animales en las que se puede encontrar este parásito (27). A la vez, debe considerarse la resistencia de este microorganismo al cloro (hipoclorito de sodio), incluso hasta concentraciones de 80 ppm durante 30 min (15).

Cyclospora cayetanensis únicamente fue aislado a partir de la lechuga con una prevalencia del 4% durante la estación seca (Cuadro 2) y sin diferencia significativa entre estaciones

climáticas, lo cual sucede en otros países como Perú (28) y Egipto (29). No obstante, su aislamiento a partir de diversos alimentos frescos ha sido informado a nivel mundial (30-33).

Concluyendo y como análisis general del presente estudio, es importante destacar el alto nivel de contaminación fecal de los productos de consumo crudo seleccionados para esta evaluación, la cual pone de manifiesto que en el país la producción y comercialización de vegetales y frutas se encuentra aún en niveles muy bajos de calidad sanitaria, y que existe un riesgo constante para la población costarricense a pesar de contar con un sistema de salud ubicado entre los mejores de América Latina.

En el caso de los microsporidios, *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora cayetanensis*, donde las técnicas de desinfección y lavado no son lo suficientemente eficientes, se hace imprescindible aplicar las Buenas Prácticas Agrícolas con el fin de garantizar un producto inocuo a la salud humana.

REFERENCIAS

1. World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington: AICR. 1997; 436-450.
2. Beuchat L. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. J Food Prot. 1996; 59:204-216.
3. Soave R, Herwaldt B & Relman D. *Cyclospora*. Inf Dis Clin North Amer. 1998; 13: 1-11.
4. Huang P, Weber JT & Soisin DM. The first reported outbreak of diarrheal illness associated with *Cyclospora* in the United States. Ann Intern Med. 1995; 123: 409-411.
5. Hoge CW, Shlim D & Rajah R. Epidemiology of diarrheal illness associated with coccidian-like organism among travelers and foreign residents in Nepal. Lancet. 1993; 341: 1175-1179.
6. Soave R. *Cyclospora*: An overview. Clin Inf Dis. 1996; 23: 429-437.
7. Jelinek T, Lotze M, Eichenlaub S, Loscher T & Northdurff HD. Prevalence of infection with *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* among international travelers. Gut. 1997; 41: 801-804.
8. Steiner T, Thielman N & Guerrant R. Protozoal agents : What are the dangers for the public water supply ? Annu Rev Med. 1997; 48: 329-340.
9. Mackenzie WR, Hoxie NJ & Proctor ME. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. N England J Med. 1994; 331: 161-167.
10. Hayes EB, Matte TD & O'Brien TR. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. N Engl J Med. 1989; 320: 1372-1376.
11. Petersen C. *Cryptosporidium* and the food supply. Lancet. 1995; 345: 1128-1129.
12. Bier JW. Isolation of parasites on fruits and vegetables. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1991; 122: 114-145.
13. Ortega Y, Roxas C & Gilman R. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected

- in markets of an endemic region in Perú. *Am J Trp Med Hyg.* 1997; 57: 683-686.
14. Monge R, Chinchilla M & Reyes L. Estacionalidad de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen crudas en Costa Rica. *Biol. Trop.* 1996; 44: 369-375.
 15. Didier E. Microsporidiosis. *Clin Inf Dis.* 1998 ; 27 : 1-8.
 16. Fernández M. Calidad sanitaria de aguas utilizadas en la irrigación de hortalizas de la provincia de Cartago-Costa Rica. INCIENSA, San José- Costa Rica. 1993; 60p.
 17. Luna S, Reyes L, Chinchilla M & Catarinella G. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp en aguas superficiales en Costa Rica. *Parasitol Latinoam.* 2203; 57: 63-63.
 18. Vanderzant C & Splittstoesser D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: APHA. 1992; 324-345.
 19. Kageruka P, Brand J, Taelman H & Jonas C. Modified Koster staining method for the diagnosis of *Cryptosporidium*. *Am Soc Belge Med Trop.* 1984; 64: 171-175.
 20. Murray P, Baron E & Pfaller M. Manual of clinical microbiology. 6th Ed. Washington, D.C: ASM Press. 1995; 44-46.
 21. Webber P, Brain RT & Owen RL. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N Eng J Med.* 1992; 26: 161-166.
 22. Cohen ML. Changing patterns of infectious disease. *Nature.* 2000; 406: 762-767.
 23. Mead PS. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5: 607-625.
 24. Monge R. Calidad Sanitaria de las hortalizas que se consumen crudas en el Valle Central de Costa Rica. Tesis. 1997; 25-72.
 25. Fernández M. Calidad Sanitaria de aguas utilizadas en la irrigación de hortalizas de la provincia de Cartago, Costa Rica. INCIENSA, San José, Costa Rica. 1993; 60.
 26. García L. Laboratory Identification of the Microsporidia. *Jour Clin Microb.* 2002 ; 40 : 1892-1901.
 27. Howe AD. *Cryptosporidium* oocysts in a water supply associated with a *Cryptosporidiosis* Outbreak. *Emerg Inf Dis.* 2002; 8: 6.
 28. Ortega, R. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1997; 57: 683-686.
 29. Abou N. Studies on a newly emerging protozoal pathogen: *Cyclospora cayetanensis*. *J Egypt Soc Parasitol.* 1999; 29: 575-586.
 30. Ho A Y & López AS. Outbreak of *Cyclospora* associated with imported raspberries. *Emerg Inf Dis.* 2002: 8: 783-788.
 31. Chiodini PL. A new parasite : human infection with *Cyclospora cayetanensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994 ; 88: 369-371.
 32. Huang P & Weber T. The first reported outbreak of diarrheal illness associated with *Cyclospora* in the United States. *Ann Intern Med.* 1995; 123: 409-414.
 33. Rivera N, Torrejon E & Madrid M. Primer hallazgo de *Cyclospora cayetanensis* en Concepción, Chile. *Parasitol al Día.* 1997; 21: 129-132.

Recibido: 14-05-2004

Aceptado: 30-09-2004